



Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit  
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg  
Direktorin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann

**PTH/PTHrP-Rezeptor-Expression im zeitlichen Verlauf einer  
experimentell induzierten Arthrose im Kaninchenmodell**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Philipp Ronstedt  
aus Geseke  
Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität  
Marburg am: 24.07.2009

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Carsten O. Tibesku

Korreferent: Prof. Dr. Achim Aigner

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Meinen Eltern**  
**Martina und Wolfgang**  
**in Liebe und Dankbarkeit gewidmet**

Aus der Klinik für Orthopädie der Philipps-Universität Marburg  
Klinik für Orthopädie und Rheumatologie  
Direktorin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann

## ZUSAMMENFASSUNG

### **PTH/PTHrP-Rezeptor-Expression im zeitlichen Verlauf einer experimentell induzierten Arthrose im Kaninchenmodell**

**Einleitung:** Die Arthrose ist eine Erkrankung von enormer sozioökonomischer Bedeutung. Vorangegangene Studien konnten eine Präsenz des PTH/PTHrP-Rezeptors in osteoarthrotischem Knorpel nachweisen und seine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen der Arthrose nahelegen. Es gibt jedoch bislang keine Informationen über die PTH1R-Expression in der Frühphase der Arthroseentstehung.

**Ziel:** Diese Studie soll die Expression des PTH1-Rezeptors im zeitlichen Verlauf einer experimentell induzierten Arthrose im Kaninchenmodell zeigen.

**Methode:** 12 ausgewachsenen Neuseelandkaninchen wurde das vordere Kreuzband reseziert (Versuchsgruppe). 12 weitere Tiere erhielten lediglich eine Eröffnung und Spülung des Gelenkes, wobei das vordere Kreuzband belassen wurde (Vergleichsgruppe). Aus jeder Gruppe wurden vier Tiere nach jeweils 3, 6 und 12 Wochen getötet und die Kniegelenke entnommen und begutachtet. 4 weitere Tiere wurden ohne vorherige Operation getötet und ihre Kniegelenke entnommen (Kontrollgruppe). Alle entnommenen Gelenke wurden hinsichtlich makroskopischen sowie mikroskopischen arthrotischen Veränderungen untersucht. Es erfolgte weiterhin eine immunhistochemische Anfärbung der PTH1R-exprimierenden Zellen.

**Ergebnis:** Nach Kreuzbanddurchtrennung zeigte sich eine deutliche, progrediente Arthroseentstehung sowie eine deutliche Abnahme PTH1R-positiver Zellen. Die Gelenke zeigten, sowohl histologisch als auch makroskopisch, signifikant höhere Arthrosegrade ( $p < 0.01$ ) als die Gelenke der Vergleichsgruppe. Es ließ sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen histologischem und makroskopischem Arthrosegrad feststellen ( $r = 0,857$ ;  $p < 0,001$ ). Der immunhistochemisch gefärbte Anteil PTH1R-exprimierender Zellen war nach 6 bzw. 12 Wochen signifikant niedriger in der Gruppe nach Kreuzbandresektion in Bezug auf die Vergleichsgruppe ( $p < 0.05$  bzw.  $p < 0,01$ ). Des Weiteren zeigte sich bei hohen Arthrosegraden ein niedriger Anteil PTH1R-exprimierender Zellen. Diesbezüglich besteht eine signifikante, negative Korrelation sowohl zwischen PTH1R-angefärbten Zellen und histologischem Arthrosegrad ( $r = - 0,601$ ;  $p < 0,001$ ) als auch zwischen PTH1R-angefärbten Zellen und makroskopischem Arthrosegrad ( $r = - 0,541$ ;  $p < 0,001$ ).

**Schlussfolgerung:** Diese Studie zeigt eine Abnahme PTH1R-exprimierender Chondrozyten im zeitlichen Verlauf einer Arthrose. Die enge Assoziation dieser Abnahme mit den makroskopisch und histologisch nachweisbaren Knorpelveränderungen lässt annehmen, dass PTH1R eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Arthrose spielt.

## ABSTRACT

### **PTH/PTHrP-receptor expression in knee joints of rabbits in experimentally induced osteoarthritis**

**Objective:** To investigate the expression of PTH1R in osteoarthritis in the rabbit knee.

**Methods:** 12 rabbits underwent a bilateral resection of the anterior cruciate ligament of the knee. In a second group of a further 12 animals the anterior cruciate ligament was retained after surgical exploration. Post-mortem examinations of the knee were conducted after 3, 6 and 12 weeks. 4 pairs of control knees were obtained from rabbits where no intervention was conducted. All knee joints were inspected for microscopic or macroscopic changes to the articular cartilage. Immunohistochemical staining was used to determine the expression of PTH1R in the articular cartilage.

**Results:** After resection of the anterior cruciate ligament a distinct, progressive osteoarthritis was evident as well as a substantial decrease of the PTH1R. These joints showed significantly higher degrees of osteoarthritis than those without resection of the anterior cruciate ligament ( $p < 0,01$ ). There was a significant, positive correlation between the microscopic and macroscopic degree of osteoarthritis ( $r = 0,857$ ;  $p < 0,001$ ). The number of PTH1R-positive cells was significantly lower 6 and 12 weeks after resection of the cruciate ligament than in the group without that ligament resection ( $p < 0,05$  resp.  $p < 0,01$ ). Joints with a high degree of osteoarthritis showed a low level of PTH1R-positive cells, and there was a significant, negative correlation between the level of PTH1R-positive cells and both the microscopic ( $r = - 0,601$ ;  $p < 0,001$ ) and the macroscopic ( $r = - 0,541$ ;  $p < 0,001$ ) degree of osteoarthritis.

**Conclusion:** This study shows a decrease in the number of PTH1R-positive cells in the process of osteoarthritis. Because of the close association of this decrease and the microscopically and macroscopically detectable degeneration it can be assumed that PTH1R plays an important role in the pathophysiology of osteoarthritis.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1: Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Das Kniegelenk .....	8
1.2 Membrana synovialis und Synovia .....	9
1.3 Der hyaline Gelenkknorpel .....	12
1.3.1 Zonale Einteilung des Gelenkknorpels .....	14
1.3.2 Chondrozyten .....	17
1.4 Arthrose.....	19
1.4.1 Ätiologie.....	20
1.4.2 Pathogenese .....	21
1.4.3 Therapie .....	27
1.5 Parathormon (PTH) .....	28
1.6 Parathormon-related peptide (PTHrP).....	30
1.6.1 PTHrP und Knochenentwicklung.....	32
1.7 PTH/PTHrP-Rezeptor.....	34
1.8 PTH1R und Arthrose.....	36
1.9 Fragestellung und Zielsetzung.....	38
 <b>Kapitel 2: Material und Methoden: .....</b>	 <b>40</b>
2.1 Versuchsaufbau .....	40
2.2 Operationsmethode.....	40
2.3 Probenentnahme und Aufbereitung der Proben .....	44
2.3.1 Probenentnahme.....	44
2.3.2 Makroskopische Beurteilung.....	44
2.3.3 Gewinnung der histologischen Schnitte.....	45
2.3.4 Färbeverfahren.....	45
2.3.4.1 Hämatoxyllin-Eosin-Färbung (HE).....	45
2.3.4.2 Safranin-O-Färbung.....	46
2.3.4.3 Immunhistochemische Färbung PTH/PTHrP-Rezeptor.....	46
2.3.5 Histologische Beurteilung .....	48
2.4 Digitale Dokumentation .....	49

2.5 Auszählen der Proben.....	50
2.6 Statistische Auswertung .....	50

<b>Kapitel 3: Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
3.1 Makroskopische Knorpelschäden.....	52
3.1.1 Ulzerationen .....	52
3.1.2 Osteophyten .....	53
3.1.3 Ergussbildung.....	54
3.2 Makroskopischer Arthrosegrad.....	57
3.3 Proteoglykanverlust .....	58
3.4 Histologischer Arthrosegrad .....	62
3.5 Immunhistochemische Färbung von PTH1R .....	67
3.5.1 Nachweis von PTH1R .....	68
3.6 Regionale Verteilung von PTH1R.....	75
3.7 PTH1R in der Membrana synovialis .....	75

<b>Kapitel 4: Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1 Diskussion der Methodik .....	78
4.1.2 Probenentnahme.....	79
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	80
4.2.1 Arthroseentstehung nach Kreuzbanddurchtrennung .....	80
4.2.2 PTH1R.....	81

<b>Kapitel 5: Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
---	-----------

<b>Kapitel 6: Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
---	------------

<b>Kapitel 7: Danksagungen.....</b>	<b>104</b>
-------------------------------------	------------

Kapitel 8: Anhang .....	i
8.1 Makroskopische Befunde .....	i
8.2 Histologische Befunde.....	ii
8.3 PTH1R-Expression.....	v
8.4 Ergebnisse – Mittelwerte .....	xii
8.5 Bescheinigungen über die Genehmigung des Tierversuches .....	xiii
8.6 Meine akademischen Lehrer .....	xviii



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Kniegelenk

Das Kniegelenk spielt im menschlichen Leben eine große Rolle. Der aufrechte Gang stellt hohe Anforderungen an seine Funktionsfähigkeit: Maximale Standfestigkeit, aber auch hohe Beweglichkeit. So kann ein menschliches Kniegelenk kurzzeitig bis zu anderthalb Tonnen stützen. Aufgrund dieser hohen Belastung beträgt das Volumen der Synovia im Kniegelenk etwa 3 ml, während in den meisten anderen Gelenken weit weniger als 1 ml Synovia vorhanden ist.

Das Kniegelenk, *Articulatio genus*, ist ein zusammengesetztes Gelenk, in dem drei Knochen miteinander artikulieren. Das Femur mit der Tibia im Femorotibialgelenk und das Femur mit der Patella im Femoropatellargelenk. Beide Gelenke besitzen eine gemeinsame Gelenkhöhle, werden von einer gemeinsamen Gelenkkapsel umschlossen und von außerordentlich starken Bändern gesichert. Das Femorotibialgelenk ist ein bikondyläres Gelenk, dessen proximaler Teil von den beiden wuchtigen, walzenförmigen Femurkondylen gebildet wird, und dessen distaler Teil aus den beiden leicht konkaven Tibiakondylen besteht [8]. Die Gelenkflächen sind mit hyalinem Knorpel überzogen.

Als Besonderheit des Kniegelenkes sind die beiden Kreuzbänder hervor zu heben. Sie sind äußerst wichtig für die Stabilität des Gelenkes. Diese beiden einzigartigen Bänder sind in der Entwicklung von dorsal her in die Gelenkhöhle (*Fossa poplitea*) eingewandert. Dabei nahmen sie die *Membrana synovialis*, nicht aber die *Membrana fibrosa* der Gelenkkapsel mit. Dadurch liegen die Kreuzbänder zwar intrakapsulär, aber extrasynovial. Sie dienen vor allem der Kontakthaltung bei Drehbewegungen und verhindern somit ein Abgleiten des Oberschenkels nach vorn oder hinten. Das vordere Kreuzband (*Ligamentum cruciatum anterius*) zieht von der *Area intercondylaris anterior tibiae* zur Innenfläche des *Condylus lateralis femoris*. Das hintere Kreuzband (*Ligamentum cruciatum posterius*) nimmt einen gegensinnigen Verlauf und zieht von der lateralen Fläche des medialen Femurkondylus zur *Area intercondylaris posterior tibiae*.

Die Kreuzbänder sind so positioniert, dass einzelne Anteile in fast allen Stellungen in Spannung geraten. Sie bilden daher eine wesentliche Sicherung des Gelenkes, besonders beim Beugen. Bei der Innenrotation wickeln sich die Kreuzbänder umeinander und begrenzen so die Bewegung. Eine weitere wichtige Aufgabe der Kreuzbänder ist die Messfühlerfunktion, auch Propriozeption genannt [8].

Zusätzlich zu den Kreuzbändern wird das Kniegelenk unter anderem durch zwei Kollateralbänder stabilisiert. Die Kollateralbänder sind bei Beinstreckung gespannt und tragen somit zur Sicherung des Kniegelenkes in Streckstellung bei.

Die aus Faserknorpel bestehenden Menisken dienen dem Ausgleich der Inkongruenz der beiden Gelenkflächen. Sie sind annähernd c-förmig, bestehen aus Faserknorpel und besitzen einen keilförmigen Querschnitt.

Die Stoßdämpferfunktion der Menisken ist erheblich höher als die des hyalinen Gelenkknorpels, da der Faserknorpel eine größere und schnellere druckvermittelte Dickenabnahme erlaubt. Bei den Bewegungen im Kniegelenk verformen und verschieben sich die Menisken auf dem Tibiakopf. Dabei ist der Laterale aufgrund der andersartigen Befestigung in einem höheren Ausmaß verschieblich als der Mediale.

Die Kniescheibe ist ein Sesambein und in die Sehne des Musculus quadriceps femoris eingebettet. Sie dient als Hypomochlion für die Patellasehne zur koordinierten Kraftübertragung. Ihre überknorpelte Rückfläche konvergiert mit der Kniescheibenrinne zwischen den Kondylen des Femurs.

## **1.2 Membrana synovialis und Synovia**

Der Gelenkspalt ist Teil der Gelenkhöhle und wird von einer bindegewebigen Gelenkkapsel allseitig umschlossen. Die Gelenkkapsel kann als Fortsetzung des Periostschlauches gesehen werden. Sie wird gebildet aus einer äußeren Membrana fibrosa und einer inneren Membrana synovialis. Die Membrana fibrosa besteht aus straffem, derbem, kollagenem Bindegewebe und ist mit dem Knochen durch überbrückende Kollagenfasern, den Scharpeyschen Fasern,

verwachsen. Des Weiteren können benachbarte Bandstrukturen sowie Muskelsehnen in die fibröse Kapsel einstrahlen. Die Gelenkbänder dienen der Stabilisierung und der zielgerichteten Führung des Gelenkes.

Die Gelenkinnenhaut besteht aus lockerem Bindegewebe und bildet gefäßreiche Falten, Plicae synoviales, und fettzellhaltige, ebenfalls vaskularisierte Zotten, Villi synoviales. Außerdem enthält sie viele Nervenfasern und Rezeptoren und ist deswegen sehr schmerzempfindlich [109]. Mikroskopisch kann die Membrana synovialis unterteilt werden in die innere, oberflächliche synoviale Intima und die äußere subintimale (subsynoviale) Schicht [115].

Die Intima ist zellreich und bildet die Schicht der Synovialdeckzellen (Synovialozyten). Die Schicht der Deckzellen ist lückenhaft und fehlt sogar abschnittsweise ebenso wie eine Basalmembran [115]. Es finden sich hier zwei unterschiedliche Zellarten. Die A-Zellen liegen hauptsächlich an der Oberfläche und bilden die Grenzschicht zur Gelenkhöhle, während die B-Zellen darunter in Richtung Subintima gelegen sind.

A-Zellen gehören dem monozytären Phagozytensystem an und entstammen dem Knochenmark. Ihre Ultrastruktur entspricht weitgehend der von Gewebemakrophagen und sie teilen mit ihnen viele Oberflächenmoleküle (u. a. MHC-II, CD68). Sie phagozytieren Bakterien und Zelltrümmer, besitzen wie Makrophagen Klasse-II-Immunorezeptoren und sind zur Antigenpräsentation befähigt. A-Zellen stehen untereinander durch gap-junctions (Nexus) und Adhärenspunkte (Puncta adhaerentia) in Verbindung. Bei chronischen Gelenkentzündungen nimmt die Zahl der Zellkontakte zu [8].

B-Zellen sind spezialisierte Fibroblasten und erscheinen im Gewebeschnitt als ovale bis rundliche Zellen. Sie können mit ihren Fortsätzen zwischen den A-Zellen hindurch die luminale Oberfläche erreichen. Gleich Fibroblasten sind sie reich an rauem ER und enthalten Sekretionsgranula. Diese Zellen bilden typische Bindegewebsmatrix mit Kollagenfibrillen, vor allem aber synthetisieren sie den größten Teil der Hyaluronsäure der Synovia. Wobei auch A-Zellen an der Synthese der Hyaluronsäure beteiligt sein sollen [8, 115]. Vorwiegend sind A-Zellen jedoch für die Aufnahme der Hyaluronsäure zuständig [4, 145].

Die Subintima ist das gefäßführende Bindegewebslager mit zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen sowie einer Menge Fettzellen, vielen vegetativen Nervenfasern und auch einzelnen Sinneskörpern. Es existieren auch Nervenendigungen, die im gesunden Gelenk stumm sind. Sie werden erst im erkrankten Gelenk erregt und tragen somit zu einer gesteigerten Schmerzempfindung bei. Die Blutkapillaren besitzen ein gefenstertes Endothel und erlauben somit einen regen Stoffaustausch [8, 115].

Die Synovialflüssigkeit (Synovia), die die Gelenkhöhle ausfüllt, entspricht weitgehend einem Dialysat des Blutes. Der Gehalt an Elektrolyten und organischen Verbindungen (u. a. Harnsäure, bis 7 mg/dl) gleicht annähernd dem des Blutes. Der Glukosespiegel ist etwas erniedrigt (60-80 mg/100 ml). Der Proteingehalt beträgt 15-25 mg/ml und besteht zu 10-20 % aus Immunglobulinen und zu über 50 % aus Serumalbumin. Außer Serumproteinen sind verschiedene Glykoproteine und Proteoglykane der extrazellulären Matrix in der Synovia zu finden, die hauptsächlich von den B-Zellen produziert werden. Die visköse, fadenziehende Eigenschaft der Synovia ist vor allem auf den hohen Gehalt an Hyaluronsäure (2-3 mg/ml) zurück zu führen [8]. Ebenfalls kommen freie Zellen in der Synovia vor (bis 100 Zellen pro  $\mu$ l). Diese Zellen sind hauptsächlich abgeschilferte Deckzellen der Membrana synovialis und Leukozyten.

Bei entzündlichen Erkrankungen kann die Zellzahl in der Synovialflüssigkeit auf bis zu 50000 pro  $\mu$ l ansteigen. Die Funktionen der Synovia bestehen zum einen in der Schmierung der Gelenkflächen und dadurch Herabsetzung der Reibung (hauptsächlich vermittelt durch Hyaluronsäure). Zum anderen wirkt sie als Stoßdämpfer zum Abfangen des Druckes auf die Gelenkflächen. Und außerdem dient die Synovia der Nährstoffversorgung des gefäßlosen Gelenkknorpels [8].

### 1.3 Der hyaline Gelenknorpel (GK)

Beim Knorpelgewebe wird unterschieden zwischen hyalinem Knorpel, elastischem Knorpel und Faserknorpel. Hyaliner Knorpel kommt im menschlichen Körper am häufigsten vor. Die drei Knorpelformen werden hauptsächlich durch Gehalt und Zusammensetzung der Faserkomponenten voneinander unterschieden. Der elastische Knorpel unterscheidet sich von ihm durch den Besitz elastischer Fasern, der Faserknorpel durch einen erhöhten Anteil an Kollagenfasern. Knorpel erfüllt als Gelenknorpel und Zwischenwirbelscheibe mechanische Aufgaben, fungiert als Stützgewebe zum Beispiel in Trachea und Ohr und dient während des Längenwachstums in der Epiphysenfuge als Vorstufe des Knochens. Beim Embryo dient hyaliner Knorpel als temporärer Baustoff des Skeletts, der während der Entwicklung durch Knochen ersetzt wird.

Der Gelenknorpel überzieht als wenige Millimeter dicke Schicht die Oberflächen der artikulierenden Knochenenden. Es handelt sich um ein avaskuläres, alymphatisches und aneurales Gewebe, und es fehlt ein Perichondrium. Während junger Knorpel in den tieferen Zonen seine Nährstoffe auch von den Markgefäßen des darunter liegenden Knochens erhalten kann, ist der ausgereifte Gelenknorpel nach Ausbildung der Verkalkungszone von diesen abgeschnitten, so dass seine Ernährung ausschließlich durch Diffusion aus dem Gelenkspalt bzw. der Synovia erfolgt [8, 72].

Die Knorpelzellen produzieren die weiträumige extrazelluläre Knorpelmatrix (EZM), woraus der GK auch zum überwiegenden Teil besteht. Sie besteht zu 70-90 % aus Wasser und 10-30 % aus organischen Matrixmolekülen. Diese setzen sich zusammen aus ca. 60 % Kollagenen (Typ II, VI, IX, X, XI), 25-30 % Proteoglykanen und 10-15 % verschiedenen Glykoproteinen [8, 14, 98]. Bei den Kollagenen handelt es sich vorwiegend um Typ-II-Fasern (90 %).

Wichtigstes Proteoglykan des Knorpels ist das Aggrekan. Aggrekanmoleküle sind durch Bindung an den bedeutenden, bis zu zwei µm langen, fadenförmigen Hyaluronsäuremolekülen aufgereiht. Durch ihre Bindung an Aggrekan spielt die Hyaluronsäure eine wichtige Rolle in der Organisation der extrazellulären Matrix. Diese Bindung wird durch ein Linkprotein, das Hyaluronektin, stabilisiert.

Ein Aggrekanmolekül besitzt Glycosaminoseitenketten vom Typ Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Durch diese negativ geladenen Sulfatseitenketten wird die Wasserbindungsfähigkeit des Aggrekans enorm gesteigert. Sie sind das wesentliche, druckaufnehmende Element im Knorpel. Sie bedingen die prallelastischen Eigenschaften und die Druckfestigkeit. Trocken es Aggrekan kann um das 50-fache seines Volumens an Wasser binden. Häufig sind mehr als 50 Aggrekanmonomere an ein Hyaluronsäuremolekül gebunden, die dann Makromoleküle von  $10^7$  bis  $10^8$  Dalton Molekulargewicht bilden. Aufgrund ihrer sehr starken Fähigkeit Wasser zu binden, sind diese Proteoglykan-Aggregate für den hohen Gewebsturgor und somit für die Permeabilität und Elastizität des Knorpels verantwortlich. Da Proteoglykanmoleküle bis auf 20 % ihres Volumens komprimiert werden können, sorgt der bei allen Körperbewegungen auftretende Wechsel von Druck und Entspannung für eine ständige Flüssigkeitsbewegung. Dies ist der Nährstoffversorgung des Knorpels durch die Synovia äußerst dienlich.

Die aggrekanreiche Matrix ist unter anderem über ihre Interaktion mit Hyaluronsäure und ihrem Rezeptor (CD44) an der Oberfläche der Chondrozyten verankert [65]. Bei arthrotischer Degeneration verändern sich der Proteoglykangehalt, der Gehalt an Hyaluronsäure und der Wassergehalt [77, 133, 140].

Zwischen den Proteoglykanen liegen, an diese elektrostatisch gebunden, Kollagenfibrillen vom Typ II. Sie verlaufen arkadenförmig im Knorpelinneren und biegen gegen die Peripherie in oberflächenparallele Richtung ab [13]. Diese Arkadenstruktur wurde bereits 1925 von Benninghoff beschrieben. Die kollagenen Fasern sind in der unterhalb der Tide Mark gelegenen kalzifizierenden Zone verankert, verlaufen senkrecht zur Oberfläche in den beiden mittleren Zonen und biegen dann in der an der Oberfläche gelegenen Tangentialzone arkadenförmig um. Dies sorgt für mehr innere Stabilität und Widerstandsfähigkeit des Knorpels bei Zug-, Druck- und Scherkräften [25].

### **1.3.1 Zonale Einteilung des Gelenkknorpels**

In seiner Gesamtheit wird der GK in oberflächenparallele Zonen untergliedert. Dabei wird zunächst einmal der kalzifizierende Knorpel von dem darüber liegenden, nichtkalzifizierenden Knorpel durch eine oberflächenparallele Grenzlinie, die „Tide Mark“, abgetrennt. Der nichtkalzifizierende Knorpel lässt sich wiederum in drei weitere Zonen unterteilen, so dass sich für die Einteilung des GKs vier Zonen ergeben: Eine oberflächliche Tangentialzone oder Superfizialzone (Zone I), eine mittlere Übergangs- oder Transitionalzone (Zone II), eine tiefe Radiärzone (Zone III) und die kalzifizierende Knorpelzone (Zone IV) unterhalb der Tide Mark [98].

Die Chondrozyten der jeweiligen Zone unterscheiden sich untereinander hinsichtlich ihrer Größe, Form, Anordnung und Stoffwechselaktivität [6]. 1996 konnten Wong et al. nachweisen, dass hinsichtlich der Zelloberfläche und des Zellvolumens eine Verdopplung von der Superfizialschicht bis zur Radiärzone auftritt. Betrachtet man den Gehalt an Granula, Zellvakuole und Vesikeln, so ist dieser in der Tangentialzone gering ausgeprägt und in der Radiärzone stark ausgeprägt [143]. Dementsprechend wird in der Radiärzone die höchste Stoffwechselaktivität angenommen [81].

Die Charakteristika der einzelnen Zonen des GKs sollen im Folgenden näher erläutert und betrachtet werden.

#### Tangentialzone

Die oberste Schicht des GKs ist auch seine Dünnste und beträgt lediglich wenige 100 µm. Die Knorpelzellen jener Schicht fallen durch ihr flaches, diskoides, spindelförmiges Aussehen auf. Sie liegen vereinzelt, und die Ausrichtung ihrer Längsachse verläuft ebenso wie die zahlreichen Kollagenfibrillen parallel zur Oberfläche [96]. Der Gehalt an Kollagen ist in dieser Schicht am größten, der Proteoglykangehalt hingegen ist hier nur sehr gering ausgeprägt [85]. Durch die zahlreichen, dicht vernetzten Kollagenfasern hat besonders die Zone I eine große innere Zugfestigkeit und gilt als mechanische Schutzschicht gegenüber Scherkräften, Abnutzung und tangentialer Dehnung. Bei degenerativen Prozessen mit Knorpelläsionen

können die oberflächlichen Kollagenfasern demaskiert werden, was dann als Fibrillationen auf der Oberfläche sichtbar wird [102].

### Transitionalzone

Die Zone II bildet die Übergangsschicht von der Tangentialzone zur Radiärzone. Die Chondrozyten nehmen eine sphäroide Form an und erscheinen rundlicher als die in der Zone I [96]. Ihre Verteilung innerhalb der extrazellulären Matrix (EZM) ist nicht mehr nur einzeln, sondern die Zellen ordnen sich mehr und mehr in kleinen Gruppen an. Der Anteil an kollagenen Fasern ist im Vergleich zur Tangentialzone geringer, während der Gehalt an Proteoglykanen deutlich zunimmt. Die Zusammensetzung der EZM ergibt für die Transitionalzone eine verminderte Widerstandsfähigkeit gegenüber Zug- und Scherkräften bei erhöhter Druckfestigkeit [108].

### Radiärzone

Die Zone III schließt oben unmittelbar an die Transitionalzone an und wird unten durch die Tide Mark von der mineralisierten Zone abgegrenzt. Die Zellen dieser Schicht haben eine runde, sphäroide Morphologie und eine zur Oberfläche senkrechte, radiäre Ausrichtung. Sie sind in einer Säulenstruktur angeordnet. Auffällig in dieser Zone ist der hohe Gehalt an RER, Golgi, Mitochondrien und Glykogen in den Zellen.

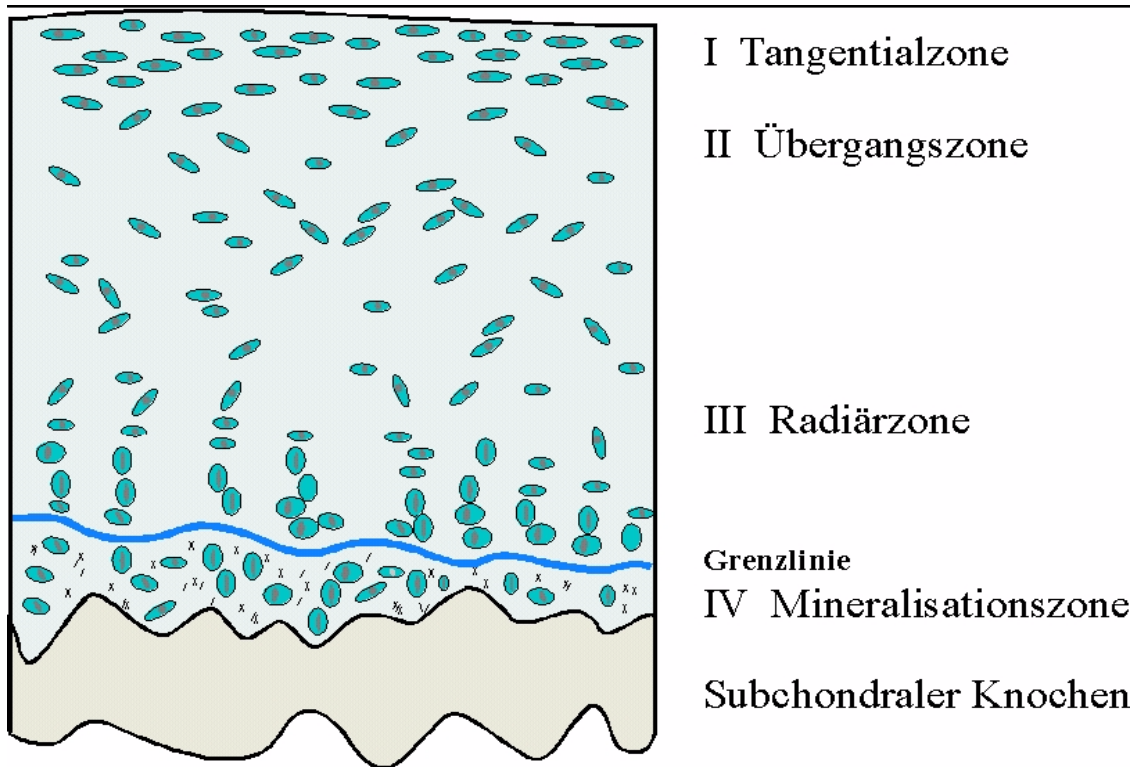
Der Kollagengehalt und der Gehalt an Proteoglykanen nehmen einen gegensinnigen Verlauf innerhalb des GKs. Während der Gehalt an Proteoglykanen mit zunehmender Tiefe ansteigt, nimmt der Kollagengehalt kontinuierlich ab [48, 96]. So ist der Proteoglykangehalt der Zone III mit 50-75 % maximal, und der Kollagengehalt ist vergleichsweise gering. Die Drucksteife dieser Schicht ist maximal ausgeprägt, während die Zugsteife in Korrelation zu dem geringen Gehalt an kollagenen Fasern gering ist.

### Mineralisierte Zone

Die Zone IV wird nach oben durch die Tide Mark von dem nichtkalzifizierten Knorpel abgegrenzt und stößt unten direkt auf den subchondralen Knochen.



Wegen eingelagerter Kalziumphosphat-Kristalle gehört die Zone IV nicht mehr zum unkalzifizierten Knorpel. Aufgrund dieser exponierten Lage kommt der mineralisierten Zone eine Pufferfunktion zu. Diese Zone ist von enormer Wichtigkeit, insbesondere im Kindes- und Jugendalter, da von ihr die enchondrale Ossifikation ausgeht. Die Zellen dieser Schicht gruppieren sich in kleineren Verbänden, liegen allerdings nicht mehr in Säulen zusammen, sondern ihre Lage ist vielmehr zufällig verteilt. Es handelt sich um runde, hypertrophe Chondrozyten, die in unkalzifizierten Lakunen liegen. Sie enthalten mäßig ausgebildetes RER und kein Glykogen [11, 96].



**Abbildung 1:** Zonen des Gelenkknorpels (übernommen aus: Der Orthopäde 8'97)

### 1.3.2 Chondrozyten

Chondrozyten sind die zelluläre Komponente des Knorpels.

Mit dem Zusammenrücken von Mesenchymzellen, direkt an der späteren Knorpel-Knochen-Grenze, beginnt beim Embryo die Knorpelentwicklung. Sie wandeln sich im weiteren Verlauf zu Precursorzellen um, wodurch ein prächondrales Gewebe entsteht, der Vorknorpel. Die Zellen des Vorknorpels differenzieren sich über Chondroblasten zu gering basophilen Chondrozyten. Sie besitzen viel RER, Golgi-Apparat und Mitochondrien. Sobald sich die Organellen für die Proteinbiosynthese dieser Zellen vergrößern, beginnen sie mit der Produktion und Ausschleusung von Tropokollagenmolekülen und Proteoglykanen, wodurch sich in der Umgebung dieser adhärent wachsenden und proliferierenden Chondrozyten eine extrazelluläre Matrix ausbildet [16, 35]. Ein Indiz für die hohe Produktionsrate von Grundsubstanz ist der hohe Gehalt von Glykogengranula in den Chondrozyten.

Diese Zellen mauern sich ein, indem sie die genannten Substanzen nach allen Seiten hin abgeben, sie rücken auseinander und nehmen die für sie typische sphärische Form an. Auf diese Weise wächst der Knorpel und die Zellen werden mit zunehmender Matrixsynthese in ihre endgültige Form und Lage gebracht [16]. Histologisch imponieren Zellnester, sogenannte Cluster, im umgebenden Kollagengerüst. In den verschiedenen Zonen des GKs lassen sich Unterschiede bezüglich Form, Lage und Stoffwechselaktivität der Chondrozyten ausmachen [5].

Der menschliche Gelenkknorpel besteht im Vergleich zu anderen Geweben nur aus einer relativ geringen Anzahl von Zellen. Der zelluläre Anteil des GKs, bezogen auf seine Gesamtmasse, liegt zwischen 1 % und 10 %. Die Zelldichte ist im menschlichen GK oberflächennah am höchsten und sinkt mit zunehmendem Abstand zur Oberfläche [119, 120]. Diese Chondrozyten sind in einer ausgeprägten extrazellulären Matrix eingebettet und liegen in Knorpelzellhöhlen, den Lakunen. Die Knorpelzellen liegen entweder einzeln oder finden sich in Gruppen von meist zwei bis acht Zellen, den Clustern, zusammen. Diese isogene Gruppe ist durch Teilung aus einer Mutterzelle entstanden. Die Clusterung findet erst postpartal statt [103]. Rund um jede Zelle

oder isogene Zellgruppe bildet die Knorpelmatrix einen Knorpelhof, der als unmittelbar zu ihr gehörig erscheint. Knorpelzellgruppe und Knorpelhof bilden ein Knorpelterritorium oder Chondron. Die Matrix zwischen den Territorien wird Interterritorium genannt. Das Chondron reguliert Umsatz und Wasseraustausch der extrazellulären Matrix [115, 137].

Die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten wird durch externe Belastung komplex beeinflusst. Der Zellmetabolismus ist abhängig von der Position der Knorpelzelle zwischen Oberfläche und Tide Mark und von der auf sie einwirkenden Kraft [6, 104]. Die zelluläre Aktivität wird so durch zelluläre Deformation entschieden beeinflusst [93]. Zytokine sind für die Kontrolle von Produktion und Abbau der Matrixkomponenten verantwortlich. Der Kontrollmechanismus für Anabolismus und Katabolismus der EZM durch Zytokine wird auf zwei verschiedenen Wegen reguliert: Zum einen durch Autoregulation, indem die Chondrozyten selbst die Zytokine freisetzen. Zum anderen durch parakrine Regulation durch die Synovialflüssigkeit.

Eine Reduktion der chondrozytären Syntheseleistung unter inadäquater mechanischer Belastung führt zum Überwiegen kataboler Prozesse und zur Knorpeldegeneration.

Bei der Knorpeldegeneration liegt besonderes Augenmerk auf der superfizialen Knorpelschicht, der Tangentialzone. Diese Zone I hat zwar aufgrund ihrer Nähe zum Gelenkspalt, und damit zur nährenden Synovialflüssigkeit, die beste Nährstoffversorgung, andererseits besitzt diese Zone mit der höchsten Zelldichte die geringste Stoffwechselaktivität. Diese Tatsache gilt als Nachteil für die Anpassungsfähigkeit auf mechanische Belastung, weswegen der Tangentialzone ein erhöhtes Arthroserisiko zugesprochen wird [9].

Bertram et Lierse konnten 1991 bei Untersuchungen von Knorpelzellhöhlen als Maß für die Zellgröße aufzeigen, dass sowohl Anzahl als auch Dichte der Knorpelzellhöhlen von superfizial nach basal abnehmen. Aufgrund der Tatsache, dass Chondrozyten bei arthrotischer Degeneration schrumpfen, werteten sie die Tendenz zu verschmälerten Chondrozytenhöhlen der superfizialen Schicht in präarthrotischem Knorpel als Atrophiezeichen.

## 1.4 Arthrose

Die Arthrosis deformans (Synonyme: Arthrose, Osteoarthrose, degenerative Arthropathie) beschreibt eine degenerative Gelenkerkrankung, die mit einer Degradation des GKs einhergeht. Sekundär treten in der Regel Umbauprozesse am Knochen und reaktive Veränderungen des Gelenkkapselgewebes sowie der umgebenden Muskulatur auf. Diese Veränderungen manifestieren sich anhand einer Verschmälerung des Gelenkspaltes, subchondraler Sklerosierung, Zysten- und Osteophytenbildung und entzündlicher Veränderungen der Synovialmembran [33]. Es kommt zu einer progredient fortschreitenden Destruktion der Matrix mit nachfolgendem Funktionsverlust.

Die Arthrose ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung, und sie manifestiert sich vornehmlich an Wirbelsäule, Knie-, Hüft- und Schultergelenk [24]. Oftmals wird sie erst spät diagnostiziert, da die Arthrose im Anfangsstadium häufig zunächst stumm verläuft. Allerdings sind bereits bei der Hälfte der 40-jährigen Bevölkerung in Deutschland röntgenologisch erste, beginnende Arthrosezeichen festzustellen. Ausgehend von Schätzungen kann man konstatieren, dass in Deutschland 8-10 Millionen Menschen mit einer Arthrose leben, wovon etwa 25 % symptomatisch sind und 5 % sich in dauerhafter, ärztlicher Behandlung befinden. Auch volkswirtschaftlich hat die Arthrose eine enorme Bedeutung: Jährlich fallen etwa 37 Millionen Krankheitstage und 4,5 Millionen Euro Kosten auf diese Gelenkerkrankung zurück [18]. Auch in den kommenden Jahren wird die Arthrose, deren Auftreten mit höherem Alter überproportional zunimmt, aufgrund der steigenden Überalterung der Gesellschaft deutlich im Budget des Gesundheitswesens zu Buche schlagen. Bereits im Jahr 2004 wurden allein im Zusammenhang mit der Behandlung, Arbeitsunfähigkeit und frühzeitiger Berentung aufgrund von rheumatoider Arthritis 5 Milliarden Euro ausgegeben [113].

Die Degeneration des GKs ist sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch erkennbar. Histologisch kommt es im Knorpelgewebe zur Demaskierung der kollagenen Fasern. In den betroffenen Knorpelpartien entstehen Zysten. An diesen Stellen sind keine Knorpelzellen mehr vorhanden. Durch diese

Destruktion nimmt die Scherfestigkeit des hyalinen GKs deutlich ab, und der einwirkende Druck kann nicht mehr ausreichend in Schub transformiert werden. Er wird somit direkt auf den Knochen übertragen. Dieser direkt auf den subchondralen Knochen einwirkende Druck bildet den Reiz für die Knochenneubildung. Dadurch kommt es zur Hypertrophie des subchondralen Knochens, Ossifikationsvorgänge des GKs werden in Gang gesetzt und es entstehen Randexostosen. So erhalten die erkrankten Gelenke ihr charakteristisches arthrotisches Aussehen [107].

Klinisch beginnt die Arthrose häufig, nach einem stummen Anfangsstadium, mit einem subjektiven Gefühl der Gelenksteifigkeit und mit Gelenkschmerzen. Charakteristisch ist der sogenannte Anlaufschmerz nach längerem Sitzen. Langsam-progredient kommt es zu auffallenden, störenden Deformitäten und einer Schmerzzunahme, die die Lebensqualität deutlich beeinträchtigen können. Durch zu hohe Belastung kommt es zu einer sekundären Synovitis, die zu einer aktivierten Arthrose führt, welche durch zusätzliche Gelenkerwärmung, Schwellung und eventuell einen Gelenkerguss gekennzeichnet ist.

Kellgren und Lawrence klassifizierten 1957 die Osteoarthrose anhand von radiologischen Kriterien. Als Kriterien berücksichtigten sie dabei Gelenkspaltverschmälerung, Osteophytenbildung, Geröllzysten und subchondrale Sklerosierung [63]. Diese Klassifikation wurde schließlich 1961 von der WHO als allgemeingültig anerkannt [82].

### **1.4.1 Ätiologie**

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass der Grund für die Entstehung einer Arthrose stets auf einem Missverhältnis zwischen erhöhter mechanischer Beanspruchung und verminderter Resistenz des GKs fußt. Man kann zwischen einer primären und einer sekundären Arthrose unterscheiden. Bei der primären (idiopathischen) Arthrose liegen die Ursachen weitgehend im Verborgenen, allerdings lässt sich feststellen, dass eine Minderwertigkeit des Knorpelgewebes vorliegt. Es gibt Hypothesen, die eine genetische Disposition erwägen, die im Zusammenhang mit biomechanischen, alters- und

geschlechtsspezifischen Faktoren zur Entstehung arthrotischer Erkrankungen führen soll.

Bei den Sekundärarthrosen handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung aufgrund bekannter Faktoren. Dazu zählen Fehlbelastung infolge von Übergewicht, Achsenfehlstellungen und Dysplasien sowie metabolische (Gicht) und endokrinologische (Hypothyreose) Störungen. Eine wichtige Ursache für die Entstehung einer sekundären Arthrose sind Traumata, wie z.B. Bandrupturen, intraartikuläre Frakturen oder Luxationen [89].

Diese Einteilung in primäre und sekundäre Arthrosen ist mittlerweile umstritten und wird von immer mehr Autoren in Frage gestellt. Die ätiologischen Faktoren gelten für sie als zu komplex und weitreichend, als dass man diese Unterteilung rechtfertigen könnte [33, 107].

### **1.4.2 Pathogenese**

Artikuläres Knorpelgewebe besitzt nur eine sehr begrenzte Fähigkeit zur Regeneration. Die Chondrozyten sind in ihren Höhlen in ihrer Mobilität und Proliferation stark eingeschränkt, wodurch sie nur äußerst unzureichend auf chronische Verletzungen oder akute traumatische Läsionen reagieren können [75]. Deswegen ist bei einer Zerstörung der Integrität des Knorpelgewebes von einer irreversiblen Schädigung auszugehen. Allerdings führt diese Schädigung nicht zwangsläufig zu einer Arthrose, so lange die Schädigung sich auf oberflächliche Schichten beschränkt und die Grenzlamelle nicht überschreitet [16, 17, 26, 125].

Die Pathogenese der Arthrose ist durch den Verlust des GKs, den Umbau des subchondralen Knochens und einer sekundären, entzündlichen Reaktion der Synovialmembran gekennzeichnet. Entscheidend für die Progredienz der Osteoarthrose ist sicherlich die Unfähigkeit der Chondrozyten den enzymatisch und mechanisch verursachten Matrixverlust zu kompensieren.

Man kann die Knorpeldegeneration in zwei Phasen unterteilen. Die initiale, hypermetabolische Phase ist geprägt durch eine kompensatorische Bildung von Matrixbestandteilen, wodurch die Chondrozyten versuchen, den Verlust an Knorpelmatrix und Knorpelhärte auszugleichen. Diese Überproduktion

geschieht überstürzt und ungeordnet. Es wandern mesenchymale Zellen aus dem subchondralen Knochen ein, und es bildet sich in Folge nur mechanisch minderwertiger Faserknorpel, der im Gegensatz zum hyalinen GK hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht. Des Weiteren ist auch sein Gehalt an Proteoglykanen deutlich vermindert, und es fehlt die Verankerung dieses Ersatzknorpels im umliegenden Gewebe. Dadurch resultiert eine weitaus geringere Resistenz des Faserknorpels gegenüber biomechanischen Stressoren wie Druck-, Scher- und Zugkräften [15, 38, 57, 114]. Nach unterschiedlich langer Zeit folgt dann die degenerative Phase, in der es infolge von enzymatischem Matrixabbau und gehemmter Matrixsynthese zu fortschreitender vollständiger Zerstörung des Knorpels kommt [141].

Essentiell für die Integrität des GKs ist ein geregeltes, physiologisches Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der EZM, insbesondere des Aggrecans. Ein chronisches Ungleichgewicht zwischen Neusynthese und Degradation von Matrixkomponenten bildet das Fundament für die Entstehung einer Arthrose. Bei diesem Ungleichgewicht sind sowohl Synthese als auch Abbau gesteigert [107]. Es kommt zunächst zu einer mikroskopischen Zerstörung von Knorpelmatrix mit Rissbildung, welche im weiteren Verlauf in einen makroskopisch sichtbaren Matrixverlust, einen Knorpelabrieb, übergeht. Neben mechanischen Belastungen spielen in diesem Prozess vor allem enzymatische Vorgänge eine enorme Rolle. Zytokine regeln die katabolen und anabolen Prozesse, deren Balance für die Erhaltung eines gesunden GKs entscheidend ist. Man unterscheidet anabole und katabole Zytokine und solche, die regulatorisch in beide Prozesse eingreifen. Die genauen Vorgänge der Pathogenese der Arthrose sind noch nicht geklärt. Im Folgenden sollen Faktoren genannt werden, die nach heutigem Kenntnisstand an der Pathogenese der Arthrose beteiligt sind.

### Interleukin-1 (IL-1)

Interleukin-1 wird vorwiegend von Chondrozyten und aktivierten Makrophagen gebildet [132]. IL-1 gilt sowohl in seiner  $\alpha$ -, wie auch in seiner  $\beta$ -Form als inflammatorisches Zytokin und gehört der Gruppe der destruktiven Zytokine an.

Es besitzt einen ausgeprägten, suppressiven Effekt auf die Proteoglykansynthese, und es fördert die Synthese des für Fibroblasten typischen Kollagens Typ I, während es die Produktion von Kollagen Typ II hemmt [141]. Das gewaltige destruktive Potential von IL-1 wird deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass dieses Zytokin die Bildung und Freisetzung kataboler Proteasen, sogenannter Matrixmetalloproteinasen (MMP), durch die Chondrozyten induziert [132]. Die MMPs bauen die Matrix ab und sorgen somit letztendlich für die Zerstörung des Knorpels. Des Weiteren hemmt IL-1 die Proliferation der Knorpelzellen, induziert in ihnen zusätzlich die Produktion von Stickoxid (NO) und führt zu einer höheren Apoptoserate. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NO selbst auch an der Apoptose von Chondrozyten und Synovialzellen beteiligt ist [2, 43].

Die zentrale Rolle des IL-1 als Botenstoff in der Pathogenese arthrotischer Erkrankungen konnte 1994 in einer Studie von Fong et al. aufgezeigt werden. Sie wiesen nach, dass IL-1-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit erosiver, rheumatoider Arthritis signifikant höher lagen als bei Patienten ohne Erosionen [34]. Es konnte festgestellt werden, dass die Konzentration von IL-1 $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -produzierenden Makrophagen in der Synovia von Arthrosepatienten deutlich erhöht ist [141]. In einer Studie von Joosten et al. wurde Mäusen, bei denen experimentell eine Arthrose induziert wurde, ein Antikörper gegen IL-1 $\beta$  verabreicht, wodurch eine starke Reduktion der Knorpelzerstörung erreicht werden konnte [58].

Auch die erhöhte Expression von IL-1-Rezeptoren ist ein Indiz für die Bedeutsamkeit dieses Zytokins im Krankheitsverlauf der Arthrose. Durch die vermehrte Anzahl an Rezeptoren erfordert die halbmaximale Stimulation zur Produktion der MMPs eine 3-4-mal geringere Konzentration an IL-1, als das in gesundem Gewebe der Fall ist. Dies hat zur Folge, dass in arthrotischem Knorpel eine 1 %-ige Sättigung der Rezeptoren mit IL-1 die Chondrozyten zur Produktion der katabolen Enzyme stimuliert. Im gesunden Knorpel wäre eine 4 %-ige Sättigung normal [141].



### Tumornekrose-Faktor (TNF)

Neben IL-1 zählt der Tumornekrosefaktor als wichtigstes destruktives Zytokin, allerdings ist sein knorpeldestruierendes Potential um das zehnfache geringer als das von IL-1. Außerdem gehören noch LIF (leukaemia inhibitory factor) und IL-17 zur Gruppe der katabolen Zytokine.

TNF wird ebenso wie IL-1 und LIF von Chondrozyten und aktivierten Makrophagen produziert und sezerniert. Seine Produktion und Präsenz im arthrotischen Knorpel ist allerdings in der Literatur noch sehr umstritten.

TNF steigert, wie IL-1, die Synthese der MMPs. Während jedoch die Wirkung von IL-1 experimentell, durch die Gabe von Anti-IL-1-Antikörpern oder Anti-IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra), neutralisiert werden konnte und somit einer progredienten Knorpelzerstörung entgegengewirkt werden konnte, wirkt eine Behandlung mit Anti-TNF-Antikörpern hauptsächlich antiinflammatorisch [132].

### Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen besteht aus mehr als 20 Enzymen, die sowohl bei der Destruktion der Gelenkknorpelmatrix, aber auch in anderen katabolen Prozessen der EZM eine entscheidende Bedeutung besitzt [32]. Es handelt sich um zinkabhängige Endopeptidasen, die ihr Optimum an enzymatischer Aktivität vorwiegend im physiologischen pH-Bereich besitzen. In aktiviertem Zustand sind sie in der Lage sämtliche Komponenten der EZM abzubauen. Insbesondere hohe Konzentrationen von MMP-1 und MMP-3 im GK fördern die Degradation, da die wichtigsten Strukturproteine des GKs zu ihren Substraten gehören. MMP-1, die auch als Kollagenase-1 oder interstitielle Kollagenase bezeichnet wird, zählt die trippelhelikalen Kollagene (Typ I, II, III, VII, VIII und X) zu ihren Substraten. Sie spaltet diese in thermolabile Fragmente. Die MMP-3 dagegen, auch Stromelysin, Transin oder Proteoglykanase genannt, spaltet Proteoglykane, Fibronectin und Laminin ebenso wie die Kollagene II, III, IV, V und IX. Die Bedeutsamkeit dieser beiden MMPs in diesem Kontext konnte bereits durch mehrere Studien belegt werden. Bei Patienten mit Gelenkerkrankungen konnte, verglichen mit der

Kontrollgruppe, eine signifikant höhere Konzentration an MMP-1 und MMP-3 in Serum und Synovialflüssigkeit dokumentiert werden [44, 87, 138].

Ein fluides Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau innerhalb des GKs ist unerlässlich. Um dieses zu erreichen, unterliegt die Synthese und Sekretion der MMPs einer Kontrolle durch Inhibitoren. Diese Inhibitoren entfalten ihre Wirkung zum einen direkt, indem sie aufgrund ihrer hohen Affinität zu den MMPs mit diesen Komplexe bilden und sie somit inaktivieren. Zum anderen indirekt durch proteolytische Spaltung des membranständigen TNF- $\alpha$  [28]. Zu den Metalloproteinase-Inhibitoren (TIMPs = Tissue inhibitor of metalloproteinases) gehören TIMP-1,-2,-3 und -4. Im Knorpel und der Synovia von Patienten mit Osteoarthritis wurden erhöhte Konzentrationen von TIMP nachgewiesen. Sie waren allerdings nicht in dem gleichen Maß erhöht wie die MMPs. Dieses Ungleichgewicht im arthrotischen Gelenk scheint bei der Progression der Arthritis von Bedeutung zu sein. Es herrscht ein relativer Mangel an Inhibitoren [123].

### Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 induziert die Proliferation von Chondrozyten und intensiviert die Wirkung von IL-1 in Bezug auf die Produktion von MMPs und die Hemmung der Proteoglykansynthese. Außerdem erhöht es die Migration von Entzündungszellen ins arthrotische Gewebe. Die Tatsache, dass IL-6 die Synthese von TIMPs stimuliert, die Synthese von MMPs aber nur indirekt, lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine Art Feedback-Mechanismus handelt, der der Knorpeldestruktion entgegenwirken könnte [79].

1997 zeigten Loo et al. in einem Versuch mit IL-defizienten Mäusen eine verminderte Entzündungsreaktion im Gelenk, jedoch eine stark erhöhte Knorpeldestruktion [131].

### Interleukin-4 (IL-4), -10 (IL-10) und -13 (IL-13)

IL-4, IL-10 und IL-13 sind regulatorische Zytokine. Sie haben die Fähigkeit Chondrozyten und Makrophagen in ihrer Produktion von IL-1 und TNF einzuschränken. Ferner können sie die Synthese von IL-1ra, dem

Rezeptorantagonist des IL-1, steigern. IL-4 hat zusätzlich einen direkt wirksamen protektiven Effekt auf die Chondrozyten, indem es die Stickoxid-Synthetase (NOS) reduziert. Stickoxid kann die Proteoglykansynthese und die Reaktion der Chondrozyten auf IGF-1 hemmen [121].

### Wachstumsfaktoren

Die Wachstumsfaktoren wirken alle zellvermehrend und stimulieren die Chondrozyten zur Synthese der EZM. Somit können sie dem katabolen Effekt von IL-1 entgegenwirken [92].

Der wichtigste anabole Wachstumsfaktor im adulten GK ist der Insuline like growth factor (IGF), der als IGF-I und IGF-II vorkommt. IGF-I reduziert den Abbau des Proteoglykans und stimuliert zusätzlich dessen Synthese [141]. IGF-II wirkt als skelettaler Wachstumsfaktor.

Andere zu erwähnende Wachstumsfaktoren sind der transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), der fibroblast growth factor (FGF) und der platelet derived growth factor (PDGF).

TGF- $\beta$  beispielsweise übt im physiologischen GK nur eine sehr geringe Stimulationskraft auf die Chondrozyten aus. Bei längerer Exposition hingegen, kann sich der Phänotyp ändern und die Chondrozyten werden gegenüber TGF- $\beta$  sensibler, so dass TGF- $\beta$  eine Steigerung der Proteoglykansynthese herbeiführt.

Erwähnung finden soll hier auch das bone morphogenic protein (BMP-2). Es wirkt auf die Synthese von Aggrekan und Kollagen Typ II unterstützend und somit in geringem Maße dem IL-1 entgegen [132]. Die Produktion von BMP-2 selbst wird durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimuliert [36]. Erstaunlich ist, dass BMP-2 im gesunden, adulten GK fast nicht vorkommt, in arthrotischem Knorpel hingegen in Mengen nachgewiesen werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass BMP-2 von arthrotischen Zellen gebildet wird. Bezüglich der Lokalisation von BMP-2 fiel auf, dass es eine zonenspezifische Verteilung gibt und im osteophytischen Gewebe eine signifikant höhere Expression von BMP-2 zu finden ist [88].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Knorpeldestruktion auf einem Ungleichgewicht anaboler zu katabolen Faktoren fußt. Es besteht eine Überproduktion an katabolen Zytokinen und eine insuffiziente anabole Kompensation.

### **1.4.3 Therapie**

Die Prävention degenerativer Gelenkerkrankungen spielt eine zunehmend große Rolle. Die beiden wichtigen Risikofaktoren für das Auftreten einer Arthrose, die Bewegungsarmut und Adipositas, sollten möglichst vermieden oder zumindest reduziert werden.

Die Behandlung der Arthrose kann grob in die chirurgisch-orthopädische und die konservative Therapie unterteilt werden.

Bis heute steht keine spezifische, kausal-konservative Therapie zur Verfügung. Deswegen ist die konservative Therapie symptomatisch ausgerichtet, und legt ihr Augenmerk darin, die Beschwerden des Patienten zu lindern und die Progredienz der Erkrankung zu verlangsamen [45]. Die Ergebnisse dieser konservativen Therapie müssen als unbefriedigend beschrieben werden, da insbesondere bei der medikamentösen Behandlung mit NSAR (Nichtsteroidale Antirheumatika) wie Cyclooxygenase-I- bzw. -II-Hemmern (COX-I- bzw. COX-II-Hemmern) nicht mit einer Heilung der Erkrankung zu rechnen ist. Andere Medikamente, die sogenannten Chondroprotektiva wie beispielsweise DMOAD (Disease modifying osteoarthritis drugs) oder SADOA (Slow acting drugs in osteoarthritis), sollen die Knorpeldestruktion bremsen und einen schmerzlindernden Effekt erzielen. Ihre Effektivität konnte allerdings noch nicht eindeutig belegt werden. Als erwiesen gilt hingegen die positive Wirkung von intraartikulären Injektionen mit Hyaluronsäurepräparaten auf die Verbesserung der viskoelastischen Eigenschaft der arthrotischen Synovia. Eine krankengymnastische Behandlung ist gleichermaßen weit von einem kurativen Ansatz entfernt und verfolgt das Ziel der Funktionsverbesserung und Funktionserhaltung des Gelenkes, wodurch der Arthroseschmerz reduziert werden soll.

Aus chirurgischer Sicht besteht die Möglichkeit, bei mittelschweren Arthrosen durch eine Gelenkspülung oder Synovektomie eine kurzfristige Beschwerdebesserung und sogar Schmerzfreiheit zu erreichen. Ist die Erkrankung weiter fortgeschritten kommen Maßnahmen zur Anwendung wie beispielsweise Umstellungsosteotomien, sofern die Knorpelzerstörung weitgehend einseitig ist, um Achsenfehlstellungen auszugleichen und die Last auf weniger geschädigte Knorpelpartien zu verteilen. Es finden auch Operationsverfahren Anwendung, die den subchondralen Knochen systematisch eröffnen, um die Bildung eines Ersatzgewebes anzuregen. Die Methode der Anbohrung durch Pridie zählt hier zu den bekanntesten und etabliertesten Verfahren [86]. Die Ultima ratio ist die Arthroplastik durch eine Endoprothese. Die Ergebnisse sind aufgrund der verbesserten Operationstechniken und modernen Prothesen gut. Problematisch bleibt die Behandlung jüngerer Patienten mit einer Endoprothese, da die Prothesen nur eine Halbwertszeit von durchschnittlich 10 bis 15 Jahren aufweisen. Auch bei älteren osteoporotischen Patienten kann die Behandlung mit einem Kunstgelenk wegen frühzeitiger Lockerung schwierig sein [45]. Aufgrund dieser Problematik sind viele Patienten nach wie vor auf einen Rollstuhl angewiesen. Die Wissenschaft legt bei der Erforschung künftiger Therapieoptionen bei Arthrose ein Augenmerk auf Proteinase- und Zytokinhemmer, Wachstumsfaktoren und Modulatoren des Knochenumbaus. Anstatt den zerstörten Knorpel durch ein Kunstgelenk oder minderwertigeres Material zu ersetzen, soll die Knorpelzerstörung von Beginn an verhindert werden [45].

### **1.5 Parathormon (PTH)**

Das Hormon der Nebenschilddrüse, das Parathormon (PTH, Synonym: Parathyrin) besteht aus 84 Aminosäuren und spielt eine äußerst wichtige Rolle in der Regulation des Kalziummetabolismus. Es wird in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse als Präpro-PTH, das aus 115 Aminosäuren besteht, gebildet [42]. Durch Abspaltung des aminoterminalen Endes und anschließender Prozessierung im Golgi-Apparat entsteht das reife PTH (1-84).

Für die Bindung des Parathormons an den Rezeptor der Zielzelle sind die Aminosäuren an den Positionen 25-34 von Bedeutung, die an den aminoterminalen, extrazellulären Bereich des Rezeptors binden. Für die Aktivierung des second messengers hingegen sind die AS 1-7 verantwortlich [29, 40, 41, 74]. Dementsprechend enthält das Fragment PTH (1-34) alle für die biologische Wirksamkeit wichtigen Abschnitte. In vivo Studien konnten keine Unterschiede zwischen PTH (1-34) und PTH (1-84) bezüglich ihrer Wirkung auf den Knochen aufzeigen [27, 117]. Hauptfunktion des Parathyrin ist die Aufrechterhaltung einer adäquaten Kalziumionen-Konzentration im Blutplasma, einer Normokalzämie. Eine Verminderung der Plasma-Kalzium-Konzentration führt dazu, dass in Sekretionsvesikeln verpackte PTH vermehrt zu sezernieren [59]. Bei einer Konzentration von 1 mmol/l ionisiertem Kalzium im Plasma wird die maximale Sekretionsrate für PTH erreicht und bei 1,25 mmol/l eine minimale PTH-Sekretionsrate von nur 10 % [64]. Den adäquaten Reiz zur Sekretion von PTH stellt demnach ein Abfall der Kalziumionenkonzentration im Blut dar. Die Kontrolle über die Parathormonsynthese hingegen übernehmen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Phosphat [10, 99]. In Säugern ist PTH der wichtigste Regulator der Kalziumionen-Homöostase. Eine Dysfunktion der Produktion und/oder Sekretion des PTHs resultiert in einer Hyper- oder Hypokalzämie. Die Zielorgane des PTHs sind vorwiegend das Knochengewebe und das Parenchym der Niere. Im Knochengewebe sorgt PTH für eine schnelle Bereitstellung von Kalzium durch enzymatische Freisetzung aus der Knochenmatrix [12]. Zusammen mit Kalzium wird Phosphat aus dem Knochen gelöst, welches anschließend durch die Niere ausgeschieden wird. PTH reguliert längerfristig den Kalzium-Haushalt durch seine direkte Wirkung auf Osteoblasten und seine indirekt aktivierende Wirkung auf Osteoklasten. Entgegen früherer, kontroverser Ansicht, ist man sich heute ziemlich einig, dass Osteoklasten selbst keine PTH-Rezeptoren besitzen, und die Wirkung des PTHs auf Osteoklasten indirekt durch Interaktion mit Osteoblasten erzielt wird [19, 73, 90]. Die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, die als Coupling bezeichnet wird, funktioniert mittels des RANK/RANK-Ligand/Osteoprotegerin-Systems. RANK-Ligand (receptor activator of NFkB

(=RANK)-Ligand, RANKL) ist ein Protein aus der Tumornekrosefamilie und wird in der Membran von Osteoblasten exprimiert. Es existiert allerdings auch in freier, sezernierter Form. RANK hingegen wird in der Membran der Osteoklasten exprimiert. RANKL kann mit RANK interagieren, wodurch eine Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten herbeigeführt wird [53]. Außerdem hemmt die Bindung von RANKL an RANK die Apoptose der Osteoklasten und verlängert somit ihre Lebensdauer. Den Gegenspieler zu diesem potenten System bildet das Osteoprotegerin (OPG). OPG wird ebenfalls von Osteoblasten in löslicher Form freigesetzt und kann an RANKL binden und es so inaktivieren. Umfassende Studien haben in den letzten Jahren aufgezeigt, dass letztlich das quantitative Verhältnis von OPG zu RANKL darüber entscheidet, ob eher die knochenaufbauende Funktion der Osteoblasten oder aber die knochenabbauende Aktivität der Osteoklasten überwiegt [53]. Parathormon kann demnach sowohl anabol, als auch katabol wirken, je nach Art der Dosierung [52]. Chevalley und Rizzoli konnten 1999 feststellen, dass bei geeigneter Applikation, nämlich durch intermittierende, subkutane Injektionen, PTH und PTHrP eine anabole Wirkung am Skelett entfalten können [21]. Dies konnte sowohl an Studien mit Ratten [83] als auch in kleinen Pilotprojekten am Menschen gezeigt werden [95, 100]. In der Behandlung der Osteoporose, besonders der Steroidosteoporose, werden aufgrund verschiedener tierexperimenteller sowie klinischer Studien große Hoffnungen in die Therapie mit rekombinantem PTH gelegt [55].

Im Nierengewebe stimuliert PTH über direkte Interaktion mit seinem Rezeptor die tubuläre Reabsorption von Kalzium und inhibiert die Resorption von Phosphat. Zusätzlich steigert PTH die Transkription der D3-1 $\alpha$ -Hydroxylase, was zur Erhöhung der 1,25(OH)<sub>2</sub>-D3-abhängigen Kalziumresorption im Dünndarm führt.

### **1.6 Parathormon-related peptide (PTHrP)**

Als es im Jahr 1987 erstmals gelang, das Parathormon verwandte Peptid (PTHrP) zu isolieren, war dies das Resultat der langjährigen Suche nach dem

Faktor, der für das Krankheitsbild der malignen assoziierten Hyperkalzämie (MAH) verantwortlich ist, eines der häufigsten paraneoplastischen Syndrome [122]. Aus seiner kalziummobilisierenden Wirkung, die stark an die des Parathormons erinnerte, erklärt sich schließlich die Nomenklatur. Anders als PTH, das nur in der Nebenschilddrüse gebildet und freigesetzt wird, wird PTHrP ubiquitär sezerniert und es wurde schnell offensichtlich, dass PTHrP viele zusätzliche Effekte hervorruft, die bei PTH nicht beobachtet werden. Aufgrund seiner ubiquitären Expression im Körper und seiner niedrigen Konzentration im Blutplasma nimmt man an, dass PTHrP seine Wirkung überwiegend autokrin bzw. parakrin entfaltet. Nach heutigem Kenntnisstand spielt PTHrP eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Gewebe. Insbesondere ist es entscheidend an der Chondrozytenproliferation und -differenzierung in der Wachstumszone des Knochens beteiligt [69, 136, 139]. Des Weiteren besitzt PTHrP eine stark relaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen [144], es ist wichtig für den transplazentären Kalziumtransport und sorgt bei der Laktation für Kalziumumlagerungen aus dem Knochen in die Muttermilch [67, 129].

Neben dem klassischen autokrinen/parakrinen Signalweg existiert ein weiterer, intrakriner Signalweg, der mit einer Translokation des Proteins in den Nukleus einhergeht. Henderson et al. konnten zeigen, dass das nukleäre PTHrP an der Regulation der Zellproliferation und des apoptotischen Zelltodes im Knochengewebe beteiligt ist [49].

Durch alternatives RNA-Splicing entstehen drei Translationsprodukte, die sich durch die Länge ihres Carboxy-Endes unterscheiden, und die alle bis zur Aminosäure 131 identisch sind. Eine Isoform endet mit 139 Aminosäuren (AS), eine zweite besitzt zwei weitere AS (141) und die dritte besteht aus 173 AS.

Innerhalb der ersten 13 AS des N-terminalen Endes weist PTHrP eine signifikante Homologie zu PTH auf. Die folgende Aminosäuresequenz 14-34 unterscheidet sich zwar von der des PTHs, doch zeigt dieser Abschnitt eine ähnliche Konformation, so dass er als PTH-ähnlich bezeichnet wird. Die restliche Aminosäuresequenz zeigt keine Verwandtschaft zu bekannten Proteinen. Die Ähnlichkeit von PTH und PTHrP in dem N-terminalen Abschnitt



erklärt die Tatsache, dass PTHrP viele Eigenschaften von PTH imitieren kann [30]. Trotz dieser Homologie und ihrer gemeinsamen kalziotropen Eigenschaften sind PTH und PTHrP Produkte unterschiedlicher Gene, die sich in ihrer Struktur deutlich unterscheiden. Das Gen, welches für PTHrP kodiert, ist viel größer, viel komplexer als das PTH-Gen und ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert. Das PTH-Gen wurde auf Chromosom 11 ermittelt [61].

Die heutigen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass PTHrP aufgrund seines Vorkommens in nahezu allen Geweben des menschlichen Körpers eine enorme Rolle bei lokalen Regulationsprozessen spielt.

### **1.6.1 PTHrP und Knochenentwicklung**

Bei der Entwicklung des knöchernen Skeletts unterscheidet man grundsätzlich zwischen der desmalen und der endochondralen Ossifikation.

Die desmale (direkte) Ossifikation findet vorwiegend bei Plattenknochen, z.B. Schädeldeckenknochen statt. Hierbei differenzieren verdichtete mesenchymale Vorläuferzellen direkt in Knochenmatrix produzierende Osteoblasten.

Bei der endochondralen Ossifikation, nach dessen Muster der Aufbau der meisten Knochen erfolgt, wird das Skelett zunächst in einem mehrstufigen Prozess als knorpelige Anlage gebildet und anschließend in Knochen umgewandelt [22]. Es beginnt mit der Kondensation und Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu knorpeligen Skelettelementen. Das Perichondrium wird von einer dünnen Schicht fibroblastenähnlicher Zellen gebildet, die mit den Chondrozyten interagieren und die Differenzierung der Knochenanlage steuern. Die Chondrozyten des Zentrums der Skelettanlage bilden das primäre Ossifikationszentrum und beginnen stark zu differenzieren, bis durch einen mehrstufigen Prozess hypertrophe Chondrozyten entstehen. Gleichzeitig differenzieren Zellen des Perichondriums in Knochenmatrix-produzierende Osteoblasten (Periosteum). Durch Einwandern von Blutgefäßen gelangen Osteoblasten und Osteoklasten in die hypertrophe Region und beginnen den hypertrophen Knorpel durch Knochengewebe zu ersetzen. Das knöcherne Zentrum expandiert in beide Längsrichtungen der Knorpelanlage.

Prä- und postnatal ist das Längenwachstum der Knochen von der Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten abhängig. Postnatal entstehen in den Knochenenden sekundäre Ossifikationszentren. Der Knorpel wird so auf die schmale Region zwischen primärem und sekundärem Ossifikationszentrum eingeschränkt und bildet die sogenannten Wachstumsfugen [135]. Die Chondrozyten an den Knochenenden differenzieren in einen anderen Knorpeltyp, den hyalinen Gelenkknorpel.

Die Regulation der beschriebenen Differenzierungsvorgänge der Knochenentwicklung erfordert ein komplexes Signalnetzwerk. PTHrP ist wesentlich an dieser Regulation beteiligt. Ebenso spielt der sekretierte Signalfaktor „Indian Hedgehog“ (Ihh) eine zentrale Rolle. Perichondrale Zellen und Chondrozyten an den Enden des Knorpelskeletts synthetisieren PTHrP. Ihh wird von Knorpelzellen produziert, die die hypertrophe Differenzierung durchlaufen.

PTHrP und Ihh regulieren die Chondrozytendifferenzierung und -proliferation in Form eines effizienten, negativen feedback loops. PTHrP bindet an den PTH1R auf nahegelegenen Chondrozyten an den Enden der Knochen und des Perichondriums, um die Proliferation der Knorpelzellen zu stimulieren und ihre hypertrophe Differenzierung zu inhibieren bzw. zu verzögern [23, 136]. Weiter entfernt gelegene Chondrozyten jedoch, und jene, die den hypertrophen Zustand erreichen, produzieren Ihh. Das gebildete Ihh wiederum stimuliert die Zellen an den Knochenenden zu vermehrter PTHrP-Produktion [68]. Dabei ist Ihh ein entscheidender Stimulus zur Synthese von PTHrP in der Knochenanlage [116].

In Studien mit PTHrP-defizienten Mäusen konnte eine verfrühte Chondrozytendifferenzierung beobachtet werden, was zu einer übermäßigen Knochenbildung führte [3, 71]. Im Gegensatz dazu konnten Weir et al. 1996 zeigen, dass eine Überexpression von PTHrP in Chondrozyten eine verzögerte Zellproliferation und fehlende Knochenbildung nach sich zog, so dass die Mäuse mit einem vollständig knorpeligen Skelett geboren wurden [139]. Diese Ergebnisse konnten durch Mutationen im humanen PTH1R-Gen, welche Skelettdysplasien zur Folge haben, bestätigt werden. Die Chondrodysplasie

Typ Blomstrand zeigt eine verstärkte endochondrale Ossifikation und eine nicht mit dem Leben vereinbare extreme Knochenbildung [3, 62, 148]. Die durch Punktmutationen hervorgerufene metaphysäre Chondrodysplasie vom Typ Jansen ist durch eine nicht vorhandene Chondrozytendifferenzierung charakterisiert [111].

### 1.7 PTH/PTHrP-Rezeptor

Aufgrund ihrer Gleichartigkeit in der N-terminalen Aminosäureabfolge und ihrer strukturellen Ähnlichkeit, teilt sich Parathormon seinen Hauptrezeptor, den PTH1-Rezeptor (PTH1R), mit PTHrP [110]. Es gilt allerdings als gesichert, dass sowohl PTHrP als auch PTH neben dem PTH1R noch weitere Rezeptoren besitzen.

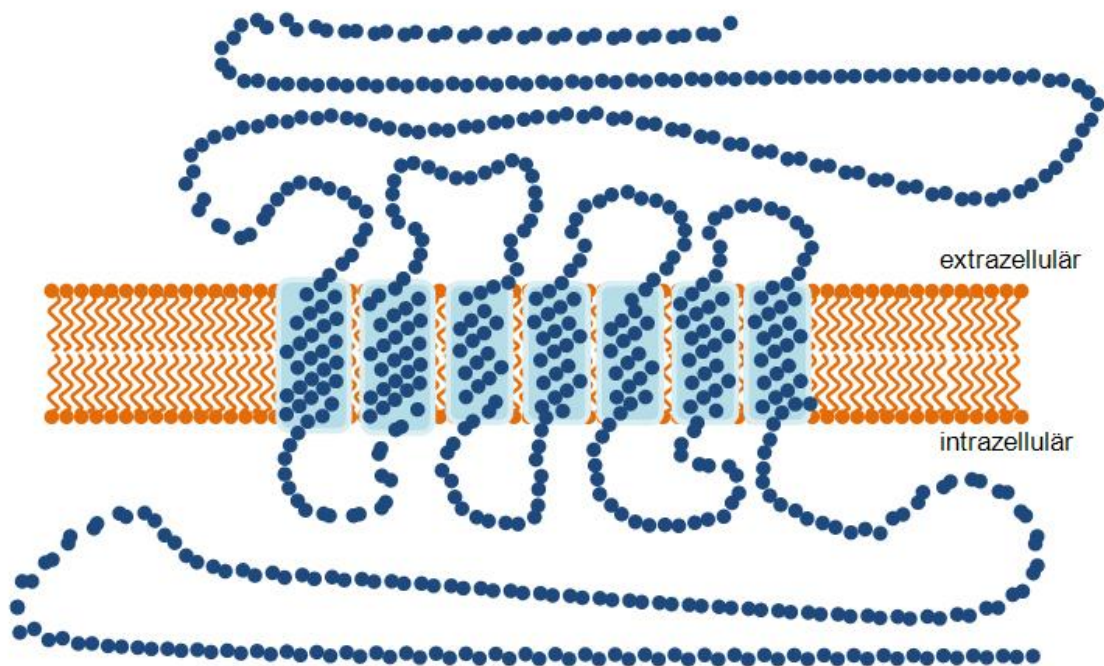
Eine hohe Expression des PTH1R konnte in den kalziumregulierenden Zellen von Niere und Knochen sowie auf den Chondrozyten der Wachstumsfuge nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung der Wachstumszone ist die Expression des PTH1Rs in der Region zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten besonders hoch [71]. Des Weiteren kommt der Rezeptor in geringerem Ausmaß in verschiedenen anderen Geweben wie Gehirn, Leber, Lunge und Herz vor [60].

PTH1R ist ein membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit einem langen, extrazellulär gelegenen, N-terminalen Ende, gefolgt von sieben Transmembranhelices und einem kurzen, intrazellulären, C-terminalen Ende (siehe Abbildung 2). Der Rezeptor zählt zur Gruppe B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und aktiviert mindestens zwei verschiedene Signalkaskaden. Dazu gehören die Modulation über den Adenylatzyklase/Proteinkinase-A-Weg mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP sowie der Ablauf über Phospholipase-C/Proteinkinase-C mit Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-3-Phosphat (IP3) mit Anstieg des intrazellulären Kalziums [78].

Funktionell lässt sich der Rezeptor in zwei Einheiten unterteilen. Das lange, extrazellulär gelegene, N-terminale Ende wird als „N-domain“ bezeichnet und der übrige juxtamembranöse Teil als „J-domain“. Während die N-domain

vorwiegend für die Ligand-Rezeptor-Bindung Sorge trägt, ist die J-domain der bestimmende Faktor für die Signaltransduktion. Gleichmaßen wie der Rezeptor besitzt auch der Ligand (PTH oder PTHrP) zwei für die Signaltransduktion wichtige Einheiten, wobei die für die Rezeptoraktivierung wichtigen Anteile in den ersten 34 AS des Liganden zu finden sind [51, 97]. Der Bereich des Liganden mit den AS 15-34 bindet mit einer hohen Affinität an die N-domain des Rezeptors. Anschließend sorgt der N-terminale Teil (AS 1-14) in Interaktion mit der J-domain des Rezeptors für die Signaltransduktion [51, 78, 97].

Die bedeutende Rolle der PTH/PTHrP-vermittelten Signalübertragung durch den PTH1R bei der Entwicklung von Knorpel und Knochen zeigt sich anhand einiger seltener, erblicher Erkrankungen, die durch eine konstitutive Aktivierung oder Hemmung der Signalübertragung des Rezeptors aufgrund von Mutationen verursacht werden. Jansens metaphysäre Chondrodysplasie zeichnet sich durch eine agonistenunabhängige, rezeptoraktivierende Mutation des PTH1R-Gens aus und führt neben einer Hyperkalzämie zu verzögertem Knochenwachstum mit Zwergwuchs und verkürzten Extremitäten sowie vermehrtem Knochenumsatz [111, 112]. Hemmende Mutationen, die die Signalübertragung am Rezeptor verhindern, zeigen das Bild einer Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand. Diese äußerst seltene Erkrankung geht mit einer frühzeitigen Skelettreifung und verstärkter Ossifikation einher und ist oftmals mit dem Leben nicht vereinbar [130].



**Abbildung 2:** PTH/PTHrP-Rezeptor (frei nach Massachusetts General Hospital; <http://www.massgeneral.org/pubaffairs/releases/MGHosteoresrch.htm>)

## 1.8 PTH1R und Arthrose

Die Rolle von PTH, PTHrP und ihres Rezeptors im Zusammenhang mit degenerativem Gelenkverschleiß ist noch weitgehend ungeklärt und bietet viel Forschungsfreiraum.

In den letzten Jahren konnten durch zahlreiche Studien Hinweise auf eine Beteiligung von PTH, PTHrP oder deren Rezeptor an der Pathophysiologie der Arthrose gefunden werden.

1997 konnte anhand von Studien erstmals die Hypothese aufgestellt werden, dass PTHrP als lokal produzierter Faktor im erkrankten Gewebe eine Rolle in der Pathologie der Arthrose spielen könnte. Kohno et al. ermittelten hohe PTHrP-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit degenerativer Arthrose (OA) und rheumatoider Arthritis (RA). Sie zeigten, dass PTHrP lokal von der Synovialmembran produziert wird und in hoher Konzentration in die Synovialflüssigkeit abgegeben wird [66]. Spätere vergleichende Studien

konnten die höheren Konzentrationen an PTHrP sowohl in der Synovialflüssigkeit, als auch im synovialen Gewebe bei RA-Patienten gegenüber Arthrosepatienten aufzeigen [37, 39, 54].

Okano et al. untersuchten Hüftkopfknochen von Patienten mit sowohl fortgeschrittener degenerativer Arthrose als auch von Patienten mit rheumatoider Arthritis und fanden heraus, dass PTHrP vorwiegend in degenerativen Läsionen des Gelenkknochen vorhanden war. Weniger evident zeigte sich PTHrP in rheumatoider Arthritis, und in gesundem Knochen ließ sich das Peptid nur in geringem Ausmaß finden. Des Weiteren zeigte die Studie, dass die PTHrP-Expression im Knochen deutlich vom Grad der Degeneration abhing. Interessanterweise zeigten die Knochen mit einer moderaten Ausprägung der Arthrose eine höhere Anzahl PTHrP-positiver Chondrozyten als diejenigen mit heftigem oder mildem Arthrosegrad [91].

Diese Ergebnisse konnten 1998 von Terkeltaub und seinen Mitarbeitern bestätigt werden. Sie untersuchten Kniegelenkknorpel von Arthrosepatienten nach Gelenkersatzoperation. Auch sie fanden erhöhte Expressionsraten von PTHrP, insbesondere der 1-173 Isoform. Des Weiteren ließ sich eine PTH/PTHrP-Rezeptor-Expression sowohl in Proben von gesundem Gelenkknorpel als auch auf Chondrozyten von arthrotischem Knochen nachweisen. In normalem Knorpelgewebe zeigte sich ein diffuses Expressionsmuster des Rezeptors, wohingegen sich die Verteilung des Rezeptors in arthrotisch verändertem Knochen relativ deutlich auf die Knorpeloberfläche beschränkte. Außerdem exprimierten im erkrankten Knochen nur wenige Chondrozyten den PTH/PTHrP-Rezeptor [124]. Eine Downregulation des Rezeptors beschrieben bereits Tsukazaki et al. 1995. Sie zeigten, dass TGF- $\beta$ , ein wichtiger Stimulator für Chondrozytenproliferation und -differenzierung, die Expression von PTHrP-mRNA stimuliert und eine Downregulation der Rezeptor-mRNA veranlasst [128]. Ferner stimulieren TNF- $\alpha$  und IL-1, zwei lokal produzierte Zytokine, denen eine entscheidende Rolle als knorpelzerstörende Faktoren angedacht wird, die gesteigerte Produktion von N-terminalem PTHrP durch Synovialozyten [37].

Bei Betrachtung subchondraler Osteoblasten zeigt sich die PTH1R-Expression bei Arthrose deutlich reduziert gegenüber normalen Osteoblasten. Ebenso zeigt sich eine erniedrigte Konzentration von PTH1R-mRNA in Osteoblasten bei Arthrose [50].

2005 untersuchten Sanchez et al. experimentell den Einfluss subchondraler Osteoblasten auf Chondrozyten in arthrotischem Knorpel. Dabei wurde unterschieden zwischen Osteoblasten aus sklerotischen Zonen des subchondralen Knochens und nichtsklerotischen Zonen. Es zeigte sich, dass die PTHrP-Expression in Chondrozyten 21-fach erhöht war nach Inkubation mit nichtsklerotischen Osteoblasten und 4-fach vermindert war nach Inkubation mit Osteoblasten aus sklerotisierten Zonen des Knochens. Außerdem induzierten sklerotische Osteoblasten, nicht aber Osteoblasten der nichtsklerotischen Zone, eine signifikante Verminderung der PTH1R-Gen-Expression in den Chondrozyten [106].

Eine tierexperimentelle Studie aus dem Jahr 2004 untersuchte die Immunlokalisation von PTHrP in Modellen zu inflammatorischer und degenerativer Knorpelzerstörung im zeitlichen Verlauf. Dazu wurde im Kaninchenmodell eine Antigen-induzierte Arthrose (AIA) einer durch partielle mediale Menishektomie induzierten Arthrose (OA) gegenübergestellt. Im späten Stadium der AIA zeigte sich gemäß früheren Studien eine Abnahme der PTHrP-Expression im Vergleich zu Kontrollproben. Bei OA-Knorpelproben hingegen konnte kein nennenswerter Unterschied der PTHrP-Färbung festgestellt werden [39].

Es lässt sich schließen, dass der Komplex aus PTHrP und seines Rezeptors in der Pathophysiologie der Arthrose eine wichtige Rolle spielen könnte. Weitere Studien sollen dazu beitragen, diese Rolle genauer zu klären.

### **1.9 Fragestellung und Zielsetzung**

Aufgrund der enormen sozioökonomischen Bedeutung der Arthrose, steht die Arthroseforschung im Zentrum vieler Forschungsgruppen. Zwar finden sich ständig neue Parameter, die Erforschung der Arthroseentstehung ist aber noch

lange nicht abgeschlossen. Wie bereits angeführt, konnten vorangegangene Studien eine Präsenz des PTH/PTHrP-Rezeptors in osteoarthrotischem Knorpel nachweisen und seine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen der Arthrose nahelegen. Es gibt jedoch bislang keine Informationen über die PTH1R-Expression in der Frühphase der Arthroseentstehung. Eine Probengewinnung von menschlichem Gewebe verbietet sich zu diesem Zeitpunkt sowohl aus ethischen als auch aus praktischen Gründen, so dass auf ein tierexperimentelles Modell zurückgegriffen werden muss. Dabei sollte die Ätiologie im Tiermodell durch geeignete Wahl der Methode zur Induktion der Arthrose dem Verlauf im menschlichen Gelenk möglichst nachkommen.

Die vorliegende Studie soll die Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors im zeitlichen Verlauf einer experimentell induzierten, sekundären, posttraumatischen Arthrose im Kaninchenkniegelenk untersuchen. Sie soll insbesondere eine mögliche Korrelation der morphologischen Veränderungen des Gelenkknorpels mit der PTH1R-Expression erforschen.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsaufbau**

Die Versuchsreihe wurde mit 28 weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Alle Kaninchen waren ausgewachsen, gleichaltrig und hatten annähernd das gleiche Gewicht. Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Der Gruppe 1, der Vergleichsgruppe, wurden 12 Kaninchen zugeteilt, die Gruppe 2, die Versuchsgruppe, bestand ebenfalls aus 12 Kaninchen und 4 Tiere gehörten der 3. Gruppe, der Kontrollgruppe, an.

Bei Gruppe 1 (Vergleichsgruppe) wurde nach beidseitiger Eröffnung der Kniegelenke das vordere Kreuzband belassen und ohne weitere Eingriffe an der Binnenstruktur der Wundverschluss durchgeführt.

Die Versuchstiere der Gruppe 2 (Versuchsgruppe) erhielten eine beidseitige Eröffnung der Kniegelenke mit bilateraler Resektion des vorderen Kreuzbandes und anschließendem Wundverschluss.

Gruppe 3 (Kontrollgruppe) erhielt keinerlei Operation. Die vier Tiere dieser Gruppe wurden, zwecks Gewinnung von Referenzwerten, bereits zu Versuchsbeginn getötet.

Die Tiere der Gruppen 1 und 2 konnten sich nach der Operation frei im Käfig bewegen. Jeweils 4 Kaninchen dieser beiden Gruppen wurden nach jeweils 3, 6 und 12 Wochen post-OP getötet.

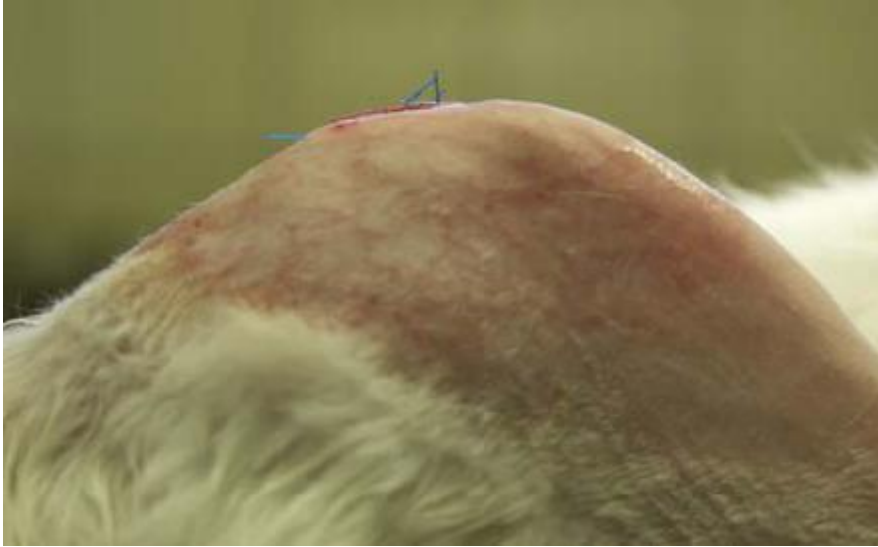
Der vorliegende Tierversuch und die Haltung der Tiere wurden von der Bezirksregierung Münster und vom Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster genehmigt und sind registriert unter der Tierversuchsnummer G 49/ 2000.

### **2.2 Operationsmethode**

Die Anästhesie aller Kaninchen wurde durch eine intramuskuläre Injektion mit Ketamin (10 %, Sanofi-CEVA GmbH) und Xylazin (2 %, CEVA) erwirkt. Dabei wurde die Dosierung der Anästhetika individuell nach klinischer Beurteilung von Pupillenweite und Reflexen gewählt und variierte stark. Anschließend wurde bei

den bereits narkotisierten Tieren eine grobe Rasur der Kniegelenke durchgeführt und diese mit medizinischer Enthaarungscreme (Plica) letztlich vollständig enthaart. Nachdem das Tier in Rückenlage gelagert war, wurde das Operationsfeld mit Neokodan mehrmals desinfiziert und steril abgedeckt.

Die Punktion des Gelenkes erfolgte von mediokaudal und es wurden jeweils 2 ml Kochsalzlösung (0,9 %) injiziert. Um die Spülflüssigkeit gut im Gelenk zu verteilen, wurde jedes Knie zwanzigmal bewegt. Anschließend wurde durch dieselbe Punktionsstelle die maximal mögliche Menge an Flüssigkeit aspiriert. Nach einer medialen, parapatellaren Inzision der Haut (ca. 3 cm), wurde das Kniegelenk eröffnet, die Patella nach lateral luxiert und das vordere Kreuzband dargestellt. Die Tiere der Vergleichsgruppe (Gruppe 1) erhielten anschließend lediglich eine weitere Kniegelenksspülung mit isotoner Kochsalzlösung (0,9 %), danach wurde das Gelenk ohne weitere Manipulation sofort verschlossen. Den Kaninchen der Gruppe 2 wurde nach der Darstellung der Kreuzbänder das vordere Kreuzband unter Verwendung eines spitzen Skalpells reseziert und das Gelenk mit 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung gespült. Zur Überprüfung der Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes wurde nach Gelenks- und Wundverschluss intraoperativ ein Lachmann-Test durchgeführt.



**Abbildung 3:** Intraoperativer Lachmann-Test: Knie in Normalstellung



**Abbildung 4:** Intraoperativer Lachmann-Test: deutlich nachweisbare vordere Schublade

Der Wundverschluss erfolgte in zwei Schichten. Nach Verschluss der Gelenkkapsel mit Einzelkopfnähten (2-0 Vicryl, Ethicon), wurde die Haut mit Einzelkopfnähten (Prolene 3-0, Ethicon, Johnson & Johnson Inh.) adaptiert. Abschließend wurde noch 0,8 ml Novalgin (Hoechst Marion Roussel) subkutan injiziert. Zur antibiotischen Prophylaxe wurde 0,8 ml eines Breitbandantibiotikums (Tardomyocel) verwendet, das ebenfalls subkutan

verabreicht wurde. Im Anschluss an die Operation konnten sich die Tiere frei in den Käfigen (100 cm x 70 cm x 40 cm) bewegen. Sie wurden engmaschig auf Infektionen und andere mögliche Komplikationen hin untersucht.



**Abbildung 5:** Wundverhältnisse postoperativ. Beide Knie



**Abbildung 6:** Wundversorgung des Kniegelenks postoperativ

## 2.3 Probenentnahme und Aufarbeitung der Proben

### 2.3.1 Probenentnahme

Die Kaninchen wurden mit Ketamin (10 %, Sanofi-CEVA) und Xylazin (2 %, CEVA) narkotisiert und dann mittels Durchtrennung der großen Halsgefäße getötet. Anschließend wurden beide Kniegelenke mittels Querinzision der Patellasehne eröffnet. Femur, Tibia und Patella wurden entnommen und bei – 80 Grad tiefgefroren. Des Weiteren wurde aus jedem Kniegelenk eine Probe der Synovialschicht der Gelenkkapsel gewonnen.

### 2.3.2 Makroskopische Beurteilung

Vor der Weiterverarbeitung der Proben wurden die entnommenen Gelenke von zwei unabhängigen Untersuchern nach 4 Kriterien makroskopisch beurteilt. Bewertet wurden das Auftreten von Fibrillationen und Ulzerationen des Knorpels sowie das Ausmaß osteophytärer Anbauten und das Bestehen eines Ergusses. Diesen makroskopischen Befunden wurde je nach Schweregrad ein Punktwert zugeordnet und die Einzelwerte zu einem Gesamtpunktwert addiert. Somit ergab sich ein Gesamtpunktwert von 0 bis 11 Punkten. Dabei entspricht ein Punktwert von 0 einer makroskopisch gesunden und intakten Gelenkfläche, ein Punktwert von 11 dagegen zeigt eine makroskopisch hochgradige Arthrose (siehe Tabelle 1).

<b>I</b>	<b>Fibrillationen</b>	<b>Grad</b>
	Keine	0
	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Ausgeprägt	3
<b>II</b>	<b>Ulzerationen</b>	<b>Grad</b>
	Keine	0
	Kleinflächig	1
	Großflächig	2

<b>III</b>	<b>Osteophyten</b>	<b>Grad</b>
	Keine	0
	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Ausgeprägt	3
<b>IV</b>	<b>Erguß</b>	<b>Grad</b>
	Keine	0
	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Ausgeprägt	3

**Tabelle 1:** Makroskopische Beurteilung

### **2.3.3 Gewinnung der histologischen Schnitte**

Die tiefgefrorenen Gelenkteile wurden in Formalinlösung (4 % gepuffertes Formalin) aufgetaut. Anschließend wurde jeweils der mediale Femurkondylus mittels einer Laubsäge entnommen und für 10 Wochen in EDTA (20 %; pH 7,4) im Wärmeschränk bei 37°C entkalkt. Nach der Entkalkung wurden die Proben über Nacht unter fließendem Leitungswasser gespült, dann jeweils 6 Stunden über 50 %, 75 % und 90 % Isopropylalkohol, und zweimal über Nacht in 100 % Isopropylalkohol bei 45° C entwässert und danach für 12 Stunden in eine Isopropylalkohol- und Paraffinmischung (1:1) bei 60° C überführt. Anschließend wurden die Proben für dreimal 12 Stunden bei 60° C in Paraffin gelegt und hinterher mittels der Einbettstation AP280 der Firma Microm in Paraffin eingebettet. Die Aushärtung der Paraffinblöcke erfolgte bei 6° C im Kühlschränk, wo sie auch aufbewahrt wurden. Mit einem Schlittenmikrotom der Firma Jung wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die Übersichtsfärbungen wurden die Schnitte mittels Eiweißglyzerins (10 Tropfen auf 100 ml destilliertes Wasser) auf Objektträger der Firma Engelbrecht aufgetragen und fixiert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Superfrost Plus Objektträger der Firma Menzel verwendet, auf denen die Schnitte mittels destillierten Wassers aufgebracht wurden. Alle Schnitte wurden anschließend auf dem Strecktisch und im Wärmeschränk bei 42° C gestreckt. Die vollständige Entkalkung wurde durch eine Alazin-rot-S-Färbung überprüft.

### **2.3.4 Färbeverfahren**

#### **2.3.4.1 Hämatoxillin-Eosin-Färbung (HE)**

Für die HE-Färbung wurden die Schnittpräparate zunächst für jeweils zweimal 5 Minuten in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in 100 %, 96 %, 70 % Ethanol) und destilliertem Wasser entparaffiniert. Die entparaffinierten Proben wurden dann für 5 Minuten in einer Hämalalaun-Färbelösung nach Meyer gebadet und im Anschluss für weitere 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Darauf folgte eine Färbung mit Eosin für 2 Minuten. Nach einer kurzen Spülung mit 70 %-igem Ethanol wurden die

gefärbten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in 96 % und 100 % Ethanol) und zweimal 5 Minuten Xylol wieder hochgeführt. Die auf diese Weise entwässerten, fertigen Präparate wurden schließlich mit Eukitt eingedeckt.

Die HE-Färbung lässt Zellkerne sowie Kalk- und Knorpelsubstanz blau erscheinen, während sich Zytoplasma, Bindegewebe, Kollagenfasern und Erythrozyten rot darstellen. Es ist eine weltweit übliche Färbemethode zur Übersicht feingeweblicher Strukturen, und die gefärbten Schnitte bleiben für Jahrzehnte erhalten und mikroskopierbar.

#### **2.3.4.2 Safranin-O-Färbung**

Die Entparaffinierung der Schnittpräparate erfolgte über zweimal 5 Minuten Xylol, einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils weitere 5 Minuten (100 %, 96 % und 70 % Ethanol) und abschließend 5 Minuten destilliertem Wasser. Die Proben wurden dann in Weigerts Eisenhämatoxin (Merck, Lösung A und B in Mischung 1:1) für 4 Minuten gefärbt und anschließend kurz in angesäuerten Alkohol (1 ml konzentrierte Salzsäure in 100 ml 70 % Ethanol) gegeben. Nach einer Wässerung für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser folgten eine dreiminütige Färbung mit Echtgrün 0,02 %, 30 Sekunden Spülung mit 1 % Essigsäure und eine Färbung mit Safranin-O für 5 Minuten. Die gefärbten Proben wurden im Anschluss mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten 70 % und 96 %, zweimal 5 Minuten 100 % Ethanol) und Xylol (zweimal 5 Minuten) entwässert. Schließlich wurden die fertigen Präparate mit Eukitt eingedeckt.

Die Safranin-O-Färbung zeigt Proteoglykane rot, das Zytoplasma grün und die Zellkerne werden schwarz dargestellt.

#### **2.3.4.3 Immunhistochemische Färbung PTH/PTHrP-Rezeptor**

Die Schnittpräparate wurden zunächst mittels Xylol (dreimal für 5 Minuten) und einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 100 %, 96 %, 70 % Ethanol) entparaffiniert und anschließend jeweils 5 Minuten mit destilliertem Wasser und

Tris Waschpuffer (0,05 M, pH-Wert 7,4-7,6) gespült. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Alle Proben wurden mit einem Fettstift (DAKO-Pen) umrandet. Die Objektträger wurden nun 5 Minuten mit Wasserstoffperoxid (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris) behandelt und anschließend dreimal 2 Minuten in Tris gespült. Auf diese Weise wurde die endogene Peroxidase irreversibel gehemmt. Es folgten zunächst eine fünfminütige Behandlung mit Proteinase K (Firma DAKO), dann 2 Minuten Spülung in kaltem, destilliertem Wasser und danach wurde der Waschvorgang mit dreimal 2 Minuten Tris-Puffer wiederholt.

Die Fixierung des Gewebes in Formalin kann zur Bildung von Aldehydvernetzungen führen, die die Gewebsantigene maskieren und so deren Nachweis durch den Primärantikörper verhindern. Proteinase K demaskiert die Antigenstellen und wurde deshalb als Vorbereitung der Färbung auf die Proben aufgetragen. Das kalte, destillierte Wasser dient dazu, die Reaktion der Proteinase wieder zu stoppen.

Nach einer zehnminütigen Inkubation der Objektträger in Kälberserum (1 % BSA in Tris, Firma Roth) und anschließendem Abkippen der Flüssigkeit, wurde der Primärantikörper gegen PTH1R in einer Verdünnung von 1:50 mit 1 % BSA aufgetragen und über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert. Die Negativkontrollen erhielten nicht den Primärantikörper, sie wurden mit einem Negative control mouse IgG 1 (Code No X 0931, DAKO) inkubiert. Dieser Nonsense-Antikörper ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, Clone DAK-GO1, und richtet sich gegen ein in Säugetiergeweben weder vorliegendes noch induzierbares Gewebe. Die Präparate wurden am darauffolgenden Tag bei Raumtemperatur 30 Minuten stehen gelassen und dann mit Tris-Puffer für dreimal 2 Minuten gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation der Proben und der Kontrollen mit dem Sekundärantikörper (anti Mouse, DAKO). Dieser wurde für 1 Stunde aufgegeben, und anschließend wurde der Waschvorgang mit dreimal 2 Minuten Tris erneut durchgeführt. Dann wurde der Farbkomplex (DAKO, AEC + High sensitivity substrate-chromogen) für 20 Minuten auf die Präparate aufgebracht. Der Farbkomplex wurde sorgfältig abgekippt. Abschließend



erfolgte eine Spülung mit dreimal 2 Minuten destilliertem Wasser und das Eindecken der Präparate mit Kaisers Glycerin Gelatine.

Bis zur digitalen Dokumentation, die in einem kurzen Abstand erfolgte, wurden die fertigen Präparate dunkel und trocken gelagert.

Knorpelzellpräparate und Synovialispräparate wurden nach demselben Verfahren gefärbt. Lediglich die Verdünnung des Primärantikörpers wurde bei der Färbung der Synovialmembran mit 1:25 anders gewählt.

### **2.3.5 Histologische Beurteilung**

Die histologische Beurteilung der Proben erfolgte anhand des MANKIN-Scores [76]. Dazu wurden die HE- und die Safranin-O-gefärbten Präparate von zwei unabhängigen Untersuchern nach vier Kriterien beurteilt. Die Knorpelproben wurden auf ihre Struktur, ihre Zellverteilung und Zelldichte hin untersucht. Ebenso bewertet wurde die Anfärbung durch Safranin-O und die Unversehrtheit der Knorpel-Knochen-Grenze.

Es wurden Punktwerte ermittelt und die Einzelpunktwerte zu einem Gesamtpunkt看wert zusammengezählt. So ergaben sich Gesamtpunktwerte von 0 bis 14 Punkten, wobei ein Punktwert von 0 einem histologisch gesunden Gelenkknorpel entspricht und 14 Punkte einer Arthrose im Endstadium gleichkommt (siehe Tabelle 2).

<b>I</b>	<b>Struktur</b>	<b>Grad</b>
	normal	0
	Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Pannus, Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Risse bis in Übergangszone	3
	Risse bis in Radiärzone	4
	Risse bis in die mineralisierte Zone	5
	Komplette Desorganisation	6
<b>II</b>	<b>Zellen</b>	<b>Grad</b>
	Normal	0
	Diffuse Hyperzellularität	1
	Cloning	2
	Hypozellularität	3
<b>III</b>	<b>Safranin-O-Färbung</b>	<b>Grad</b>
	Normal	0
	Geringfügige Reduktion	1
	Mäßige Reduktion	2
	Starke Reduktion	3
	Keine Färbung nachweisbar	4
<b>IV</b>	<b>Integrität der Knorpel - Knochengrenze</b>	<b>Grad</b>
	Intakt	0
	Von Blutgefäßen durchzogen	1

**Tabelle 2:** Mankin Score, histologische Beurteilung nach Mankin

## 2.4 Digitale Dokumentation

Um die immunhistochemisch gefärbten Proben vor dem Verfall zu schützen und sie dauerhaft digital archivieren zu können, wurden die Proben nach Abschluss der Färbung mit einer Digitalkamera fotografiert. Zu diesem Zweck wurde die Kamera Cool-SNAP-Pro Digital Kit TM Version 4.0 (Media Cybernetics, USA) auf dem Photomikroskop III der Firma Carl Zeiss installiert und an einen Computer (Intel Pentium III, Microsoft Windows NT) angeschlossen. Anschließend wurden von den Proben in verschiedenen Vergrößerungen digitale Photos erstellt und archiviert. Für die Auswertung der angefärbten Zellen wurde das Objektiv mit der 16-fachen Vergrößerung gewählt. Mit diesem

Objektiv wurden von allen Proben 2-6 repräsentative Bildausschnitte ausgewählt und Digitalfotos erstellt.

### **2.5 Auszählen der Proben**

Die Knorpelzellen wurden zunächst unterteilt und gezählt nach „angefärbt“ und „nicht angefärbt“. Anschließend wurden sie noch hinsichtlich ihrer Färbung in drei Gruppen unterteilt, in „stark gefärbte Zellen“, „einfach gefärbte Zellen“ und „nicht gefärbte Zellen“. Um die Zellen möglichst eindeutig ihrer Gruppe zuordnen zu können, wurden vor der eigentlichen Auszählung von drei unabhängigen Untersuchern Stichproben ausgewertet und diese Ergebnisse anschließend verglichen, um Kriterien hinsichtlich der Diskriminierung der einzelnen Zellen zu schaffen, und somit die Knorpelzellen eindeutig einer Gruppe zuordnen zu können. Im Anschluss an die Auszählung wurde das Ergebnis wiederum stichprobenartig von zwei Untersuchern überprüft. Die Tatsache, dass jede einzelne Digitalfotografie nicht maschinell, sondern persönlich von einem Untersucher ausgezählt wurde, und zudem der Versuch als Doppelblind-Studie durchgeführt wurde, verringert das Risiko artifiziell veränderter Resultate.

Die Ergebnisse eines jeden Präparates wurden tabellarisch aufgelistet, und die prozentuale Anzahl gefärbter sowie nicht gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl der gemachten Aufnahmen wurde ermittelt.

Mit den gefärbten Präparaten der Synovialmembran konnte nicht in gleicher Weise verfahren werden. Einige Proben enthielten keine Synovialmembran, in anderen konnten die einzeln gefärbten Zellen nicht eindeutig voneinander abgegrenzt und gezählt werden, so dass sich bezüglich der PTH1R-Expression auf Synovialozyten nur eine Tendaussage anstellen lässt.

### **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten wurde mithilfe des Computerprogramms SPSS 16.0 durchgeführt.

Beim Vergleich der Gruppen untereinander wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die Korrelation der untersuchten Merkmale des Knorpelgewebes wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde mit  $p < 0,05$  angelegt. Der Grenzwert, der auf einen hochsignifikanten Unterschied hinweist, wurde bei  $p < 0,01$  festgelegt. Die erhobenen Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die erstellten Diagramme wurden mithilfe des Programms Excel 2007 angefertigt.

### **3 Ergebnisse**

Der Versuch wurde mit 28 ausgewachsenen, gleichaltrigen, weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere ein durchschnittliches Gewicht von  $4193,75 \text{ g} \pm 298,84 \text{ g}$ . Zum Zeitpunkt der Tötung wogen sie durchschnittlich  $4274,64 \text{ g} \pm 462,49 \text{ g}$ .

Vor der Operation erkrankte ein Tier, so dass es nicht in den Versuch aufgenommen und durch ein gesundes ersetzt wurde. Postoperativ kam es bei zwei Kaninchen zur Entstehung eines Hämatoms, das sich jedoch in beiden Fällen komplikationslos zurückbildete. Ein Tier entwickelte postoperativ eine eitrige Wundinfektion, die jedoch nach einmaliger Gabe von 0,8 ml Tardomyocel zügig abheilte. Bei einem weiteren Tier wurde aufgrund einer Wunddehiszenz eine Folgeoperation notwendig, bei der die Kutis wieder verschlossen wurde. Alle übrigen Tiere zeigten einen komplikationslosen Heilungsverlauf.

Zum Zeitpunkt der Tötung war bei elf Tieren der Gruppe mit Kreuzbanddurchtrennung (Versuchsgruppe) diese auch nachweisbar. Bei einem Tier dieser Kohorte war das vordere Kreuzband intakt und es wurde nicht in die Wertung aufgenommen. Alle Kaninchen der Vergleichs- und Kontrollgruppe wiesen zum Zeitpunkt der Gelenkentnahme ein unversehrtes vorderes Kreuzband auf.

#### **3.1 Makroskopische Knorpelschäden**

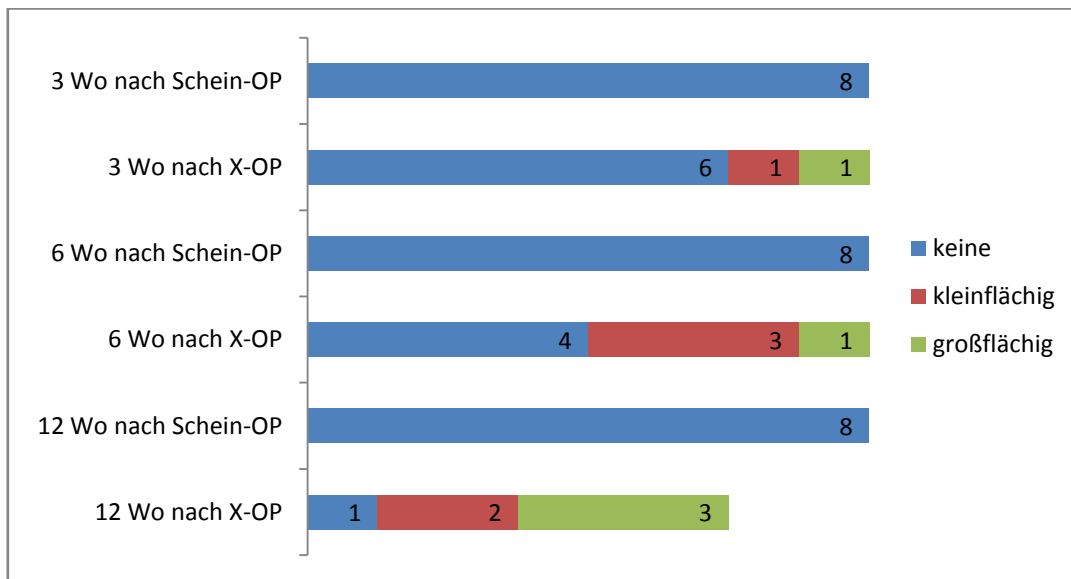
##### **3.1.1 Ulzerationen**

Die entnommenen Femurkondylen wurden begutachtet und auf makroskopische Veränderungen überprüft.

In der Versuchsgruppe konnte nach 3 Wochen bei 6 Gelenken keine Ulzerationen des Knorpels nachgewiesen werden, 1 Gelenk zeigte kleinflächige und 1 weiteres großflächige Ulzerationen. 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung wiesen bereits 3 Gelenke kleinflächige und 1 Gelenk

großflächige Ulzerationen auf, die übrigen 4 Gelenke ließen keinen ulzerativen Knorpelschaden erkennen. 12 Wochen postoperativ zeigte nur noch 1 Gelenk keine Ulzerationen. 2 Gelenke präsentierten kleinflächige, die übrigen 3 großflächige, ulzerative Knorpeldefekte.

Die 24 Gelenke der Vergleichsgruppe wiesen ausnahmslos keine Ulzerationen auf (siehe Abbildung 7).

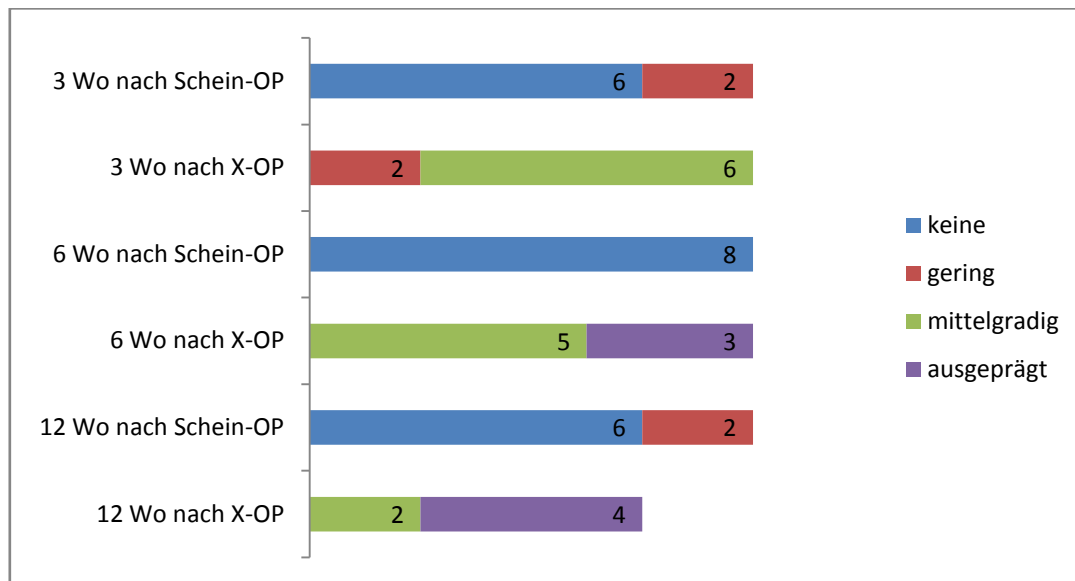


**Abbildung 7:** Anzahl der Gelenke mit Ulzerationen des Knorpels in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

## 3.1.2 Osteophyten

Alle Gelenke der Versuchsgruppe zeigten zum Zeitpunkt ihrer Entnahme osteophytäre Anbauten, die im zeitlichen Verlauf an Ausmaß zunahmen. Nach 3 Wochen wiesen 2 Gelenke geringe und 6 Gelenke mittelgradige Osteophytenbildung auf. 6 Wochen postoperativ präsentierten bereits 5 Gelenke ein mittelgradiges Maß an Osteophyten und bei 3 Gelenken war die Osteophytenbildung ausgeprägt. 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung schließlich lagen bei 4 Gelenken ausgeprägte osteophytäre Anbauten vor und bei 2 Gelenken zeigten sich mittelgradige Osteophyten. In der Vergleichsgruppe

wiesen lediglich 4 Gelenke Osteophyten auf, die übrigen 20 zeigten sich hinsichtlich Osteophytenbildung unversehrt (siehe Abbildung 8).

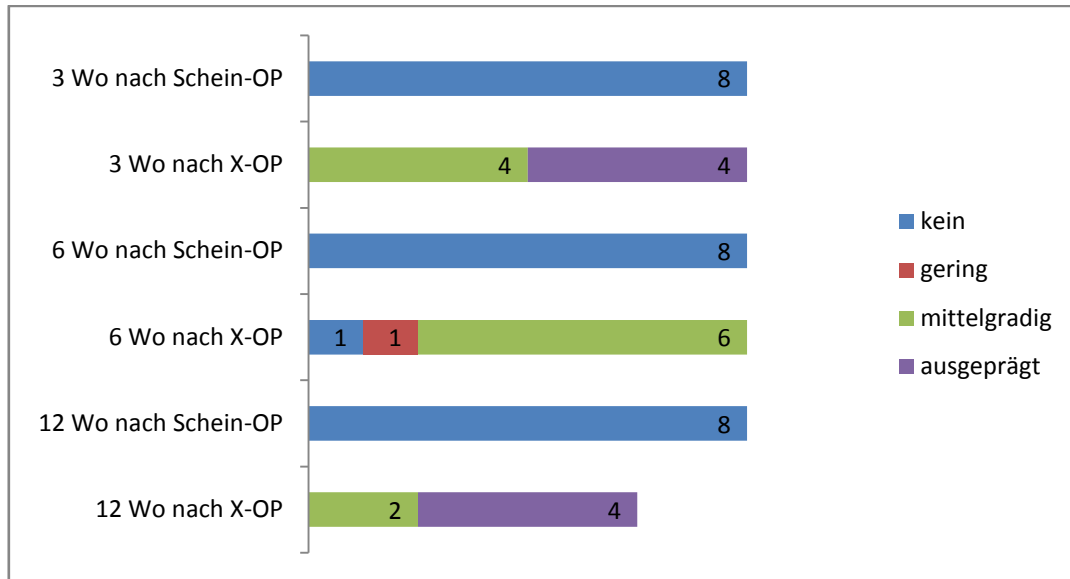


**Abbildung 8:** Anzahl der Gelenke mit Osteophyten in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

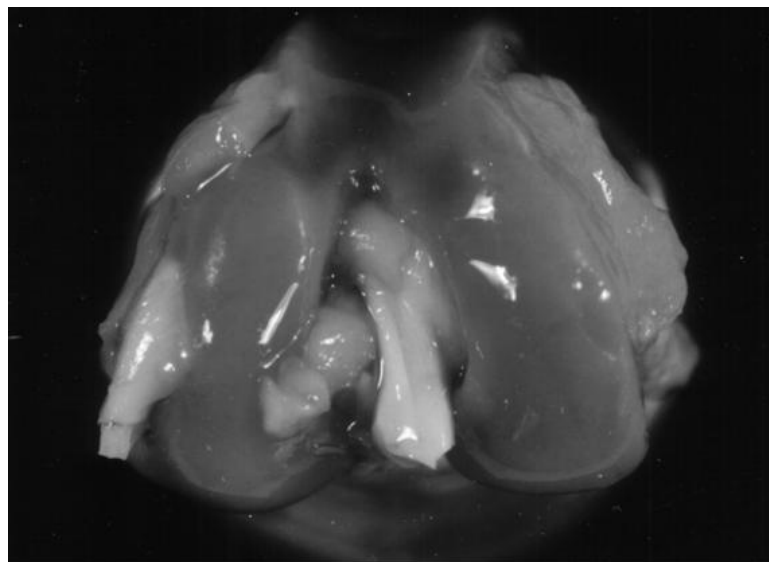
### 3.1.3 Ergussbildung

Zum Zeitpunkt der Gelenkentnahme wurde durch Punktion Synovialflüssigkeit entnommen und die Ergussmenge beurteilt. Dabei zeigte sich in der Versuchsgruppe nach 3 Wochen bei jeweils 4 Gelenken ein mittelgradiger bzw. ausgeprägter Gelenkerguss. 6 Wochen postoperativ ließ sich bei 6 Gelenken ein mittelgradiger Erguss feststellen, 1 Gelenk wies einen geringen Erguss auf, und 1 weiteres Gelenk zeigte keinen Erguss. 12 Wochen nach der Operation präsentierten 4 Gelenke einen ausgeprägten, die 2 übrigen einen mittelgradigen Erguss.

Kein Gelenk der Vergleichsgruppe wies einen wesentlichen Erguss auf (siehe Abbildung 9).

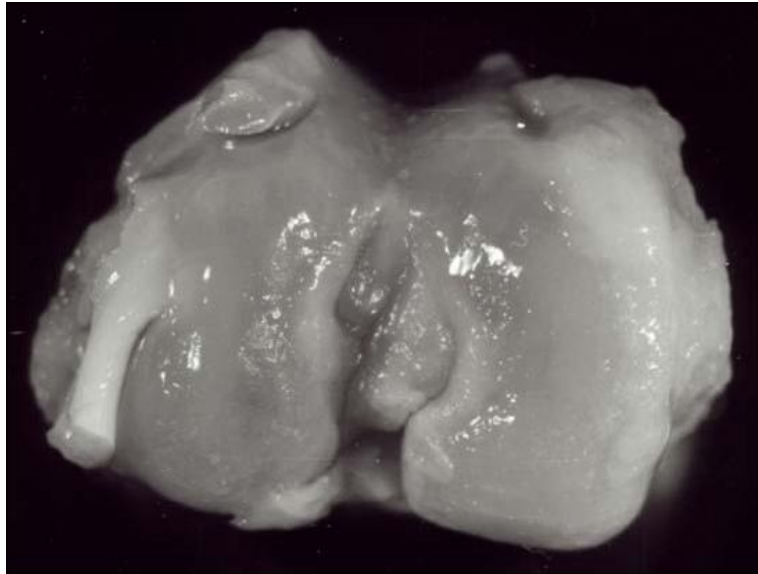


**Abbildung 9:** Anzahl der Gelenke mit Erguss in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

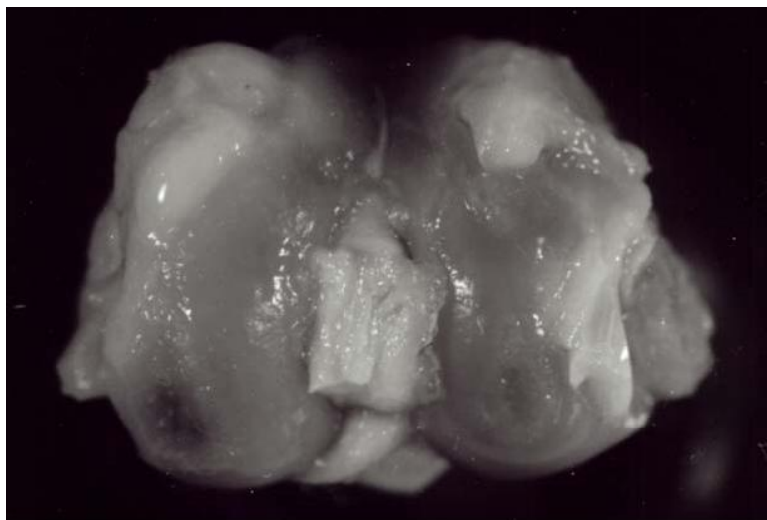


**Abbildung 10:** Intakter Knorpel beider Femurkondylen eines nicht operierten Tieres der Kontrollgruppe

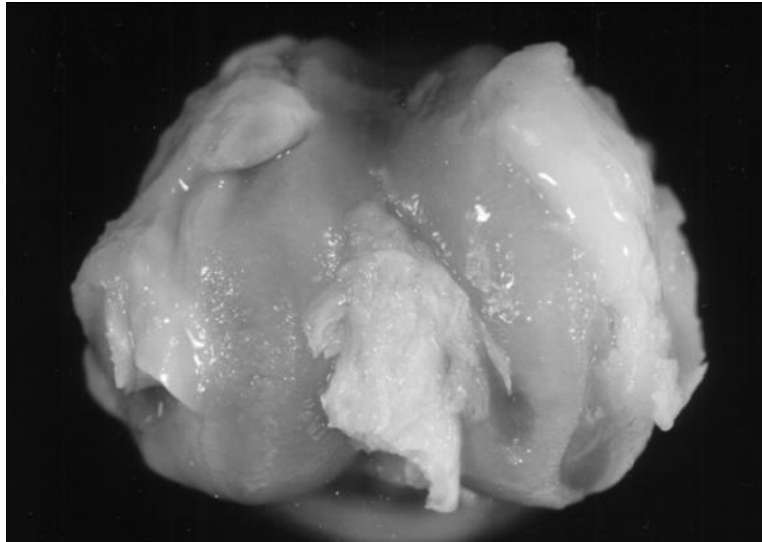




**Abbildung 11:** Deutliche Fibrillationen und Osteophytenbildung beider Femurkondylen (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



**Abbildung 12:** Beginnende Knorpeldefekte bis auf den subchondralen Knochen mit ausgeprägter Osteophytenbildung (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

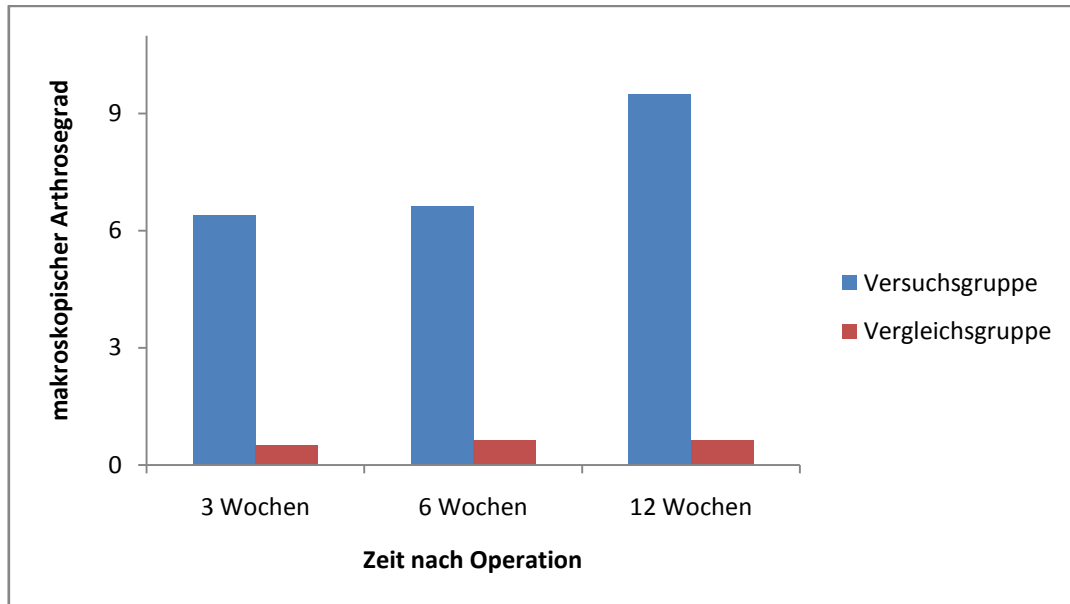


**Abbildung 13:** Deutlicher Knorpeldefekt mit Freilegung des subchondralen Knochens und ausgeprägter Osteophytenbildung (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

### 3.2 Makroskopischer Arthrosegrad

Die Untersuchung der Gelenkfläche des Femur auf Anzeichen einer Arthroseentwicklung ergab sowohl bei Tieren der Gruppe 1 als auch in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung Hinweise auf eine derartige degenerative Schädigung. In der Gruppe der nicht operierten Tiere (Gruppe 3) beträgt der Mittelwert des makroskopischen Arthrosegrades  $0,38 \pm 0,52$ . Die Tiere der Gruppe nach Kreuzbandresektion wiesen signifikant höhere, makroskopische Arthrosegrade auf als die Vergleichsgruppe ( $p < 0,01$ ). Hier liegt der Mittelwert der makroskopischen Arthrosegrade der Versuchsgruppe nach 3 Wochen bei  $6,38 \pm 1,77$ , nach 6 Wochen bei  $6,63 \pm 2,26$  und steigt nach 12 Wochen auf  $9,5 \pm 1,05$ . Im Vergleich dazu ergibt sich in der Gruppe nach Scheinoperation (Gruppe 1) nach 3 Wochen ein Mittelwert von  $0,5 \pm 0,76$ , nach 6 Wochen liegt er bei  $0,63 \pm 0,74$  und nach 12 Wochen bei  $0,63 \pm 0,52$ .

In der Versuchsgruppe korreliert der makroskopische Arthrosegrad deutlich mit der Anzahl in Wochen nach der Operation (Korrelationskoeffizient: 0,52;  $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 14)



**Abbildung 14:** Vergleich des makroskopischen Arthrosegrades der Versuchsgruppe und Vergleichsgruppe

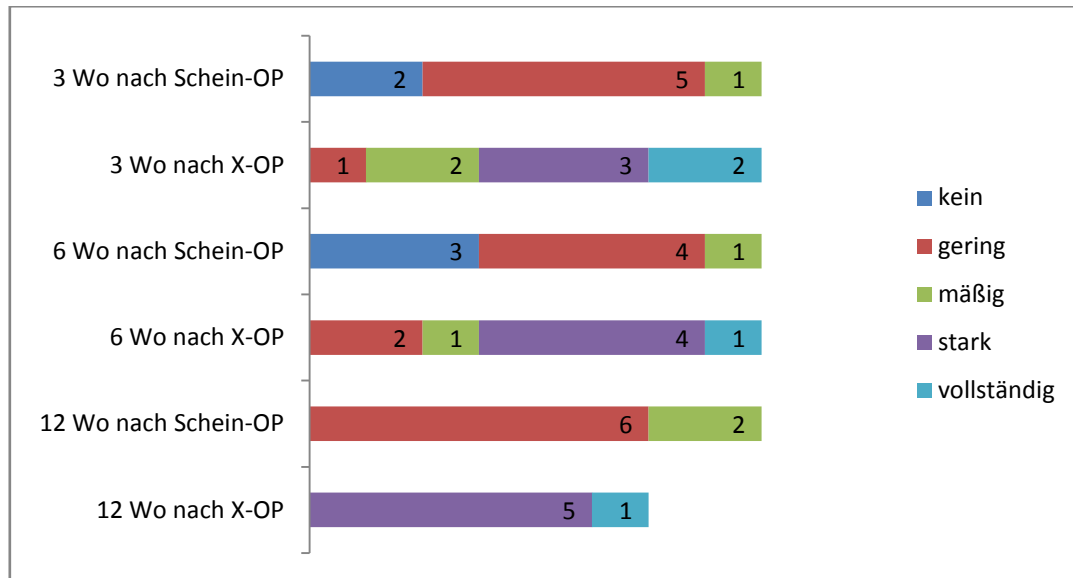
### 3.3 Proteoglykanverlust

Mithilfe histologischer Färbemethoden lässt sich der Proteoglykangehalt der extrazellulären Matrix in den untersuchten Gruppen vergleichen. Es fällt ein Proteoglykanverlust im Knorpel der Tiere der Versuchsgruppe auf, der mit steigender, postoperativer Wochenzahl an Intensität zunimmt.

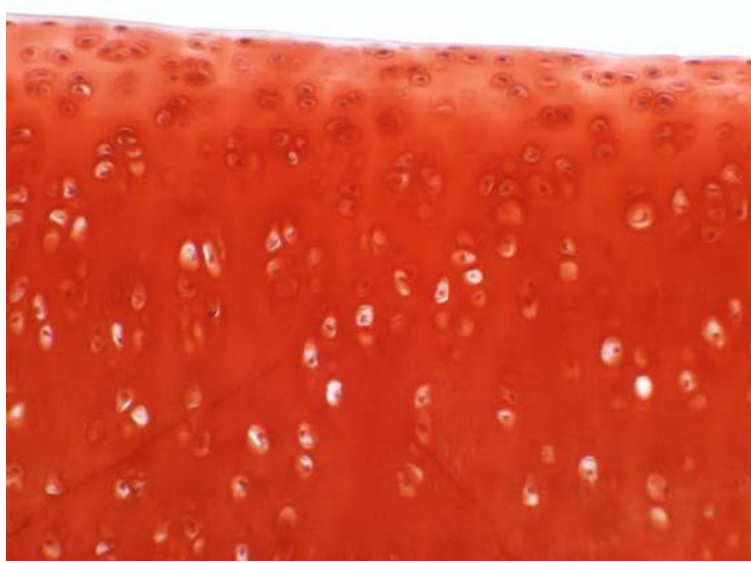
3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung zeigten bereits 2 Gelenke einen vollständigen Proteoglykanverlust, 3 Gelenke eine starke Reduktion der Proteoglykane, 2 weitere eine mäßige und 1 Gelenk eine geringfügige Reduktion. 6 Wochen nach der Operation wies 1 Gelenk einen totalen Verlust an Proteoglykanen auf, 4 Gelenke zeigten einen starken Rückgang, bei einem Gelenk war die Reduktion mäßig und bei 2 als gering einzustufen. Nach 12 Wochen konnte man bei einem Gelenk einen vollständigen Proteoglykanverlust und bei 5 weiteren eine starke Reduktion feststellen.

Im Unterschied dazu zeigten die Gelenke der Gruppe 1 nach 3 Wochen bei 2 Gelenken keine Reduktion der Proteoglykane, 5 Gelenke wiesen eine geringfügige und 1 Gelenk eine mäßige Reduktion auf. 6 Wochen nach der

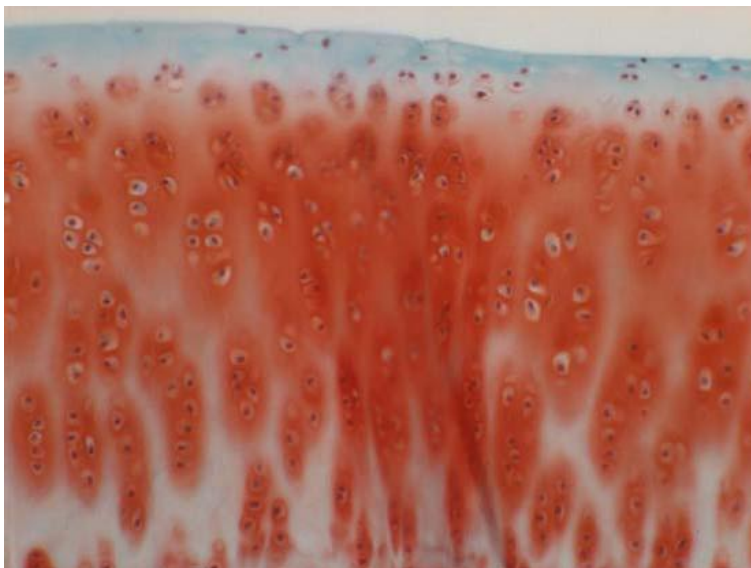
Scheinoperation ließ sich bei 3 Gelenken keine Reduktion feststellen, 4 Gelenke präsentierten einen geringfügigen und ein Gelenk einen starken Rückgang der Proteoglykane. Nach 12 Wochen war bei 6 Gelenken eine geringfügige und bei 2 Gelenken eine mäßige Reduktion der Proteoglykanfärbung nachweisbar (siehe Abbildung 15).



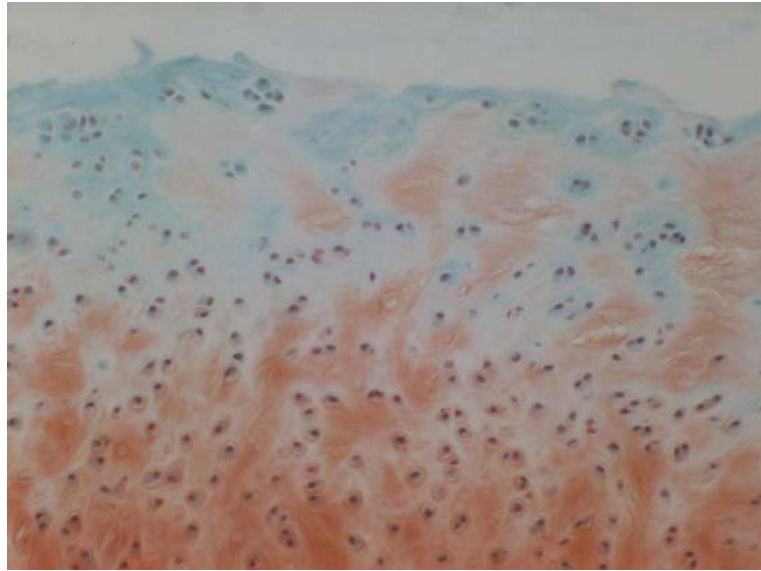
**Abbildung 15:** Anzahl der Gelenke mit Proteoglykanverlust in Abhängigkeit der Wochen nach der Operation



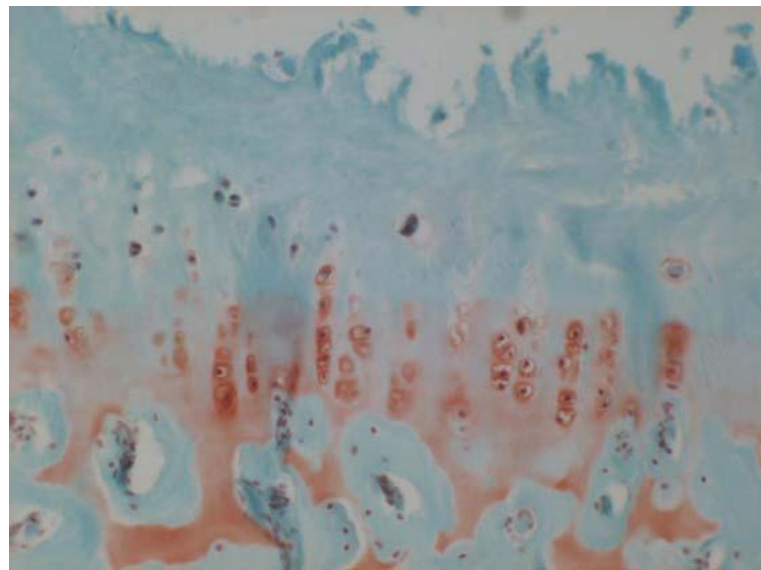
**Abbildung 16:** Kräftige Anfärbung der Proteoglykane; kein Proteoglykanverlust  
(6 Wochen nach Scheinoperation)



**Abbildung 17:** Geringe Reduktion der Färbungsintensität aufgrund beginnenden  
Proteoglykanverlustes (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



**Abbildung 18:** Mäßige Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fortgeschrittenen Verlustes an Proteoglykanen (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



**Abbildung 19:** Starke Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fast vollständigen Proteoglykanverlustes (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

### 3.4 Histologischer Arthrosegrad

Bei mikroskopischer Betrachtung wurden alle 54 Gelenke auf Anzeichen einer Arthrose hin untersucht und anhand des Mankin Scores klassifiziert.

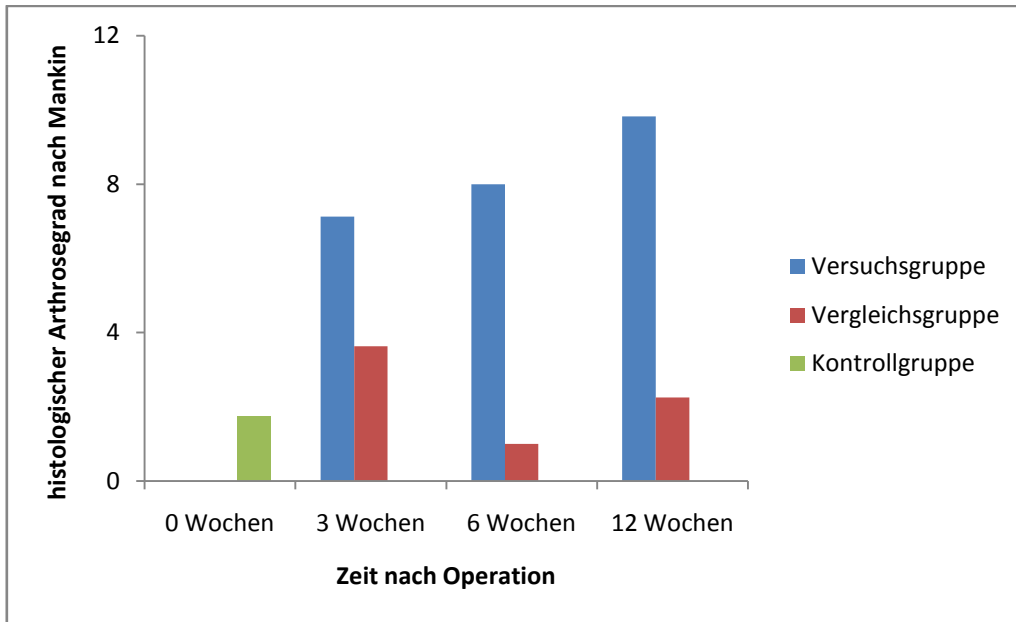
Histologische Knorpelschädigungen fanden sich in allen Gruppen. Es lässt sich aber feststellen, dass die Knorpel der Tiere nach Kreuzbanddurchtrennung signifikant höhere histologische Arthrosegrade aufwiesen als die der Vergleichsgruppe ( $p < 0,01$ ).

Der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades in der Gruppe der nicht operierten Tiere beläuft sich auf  $1,75 \pm 1,58$ .

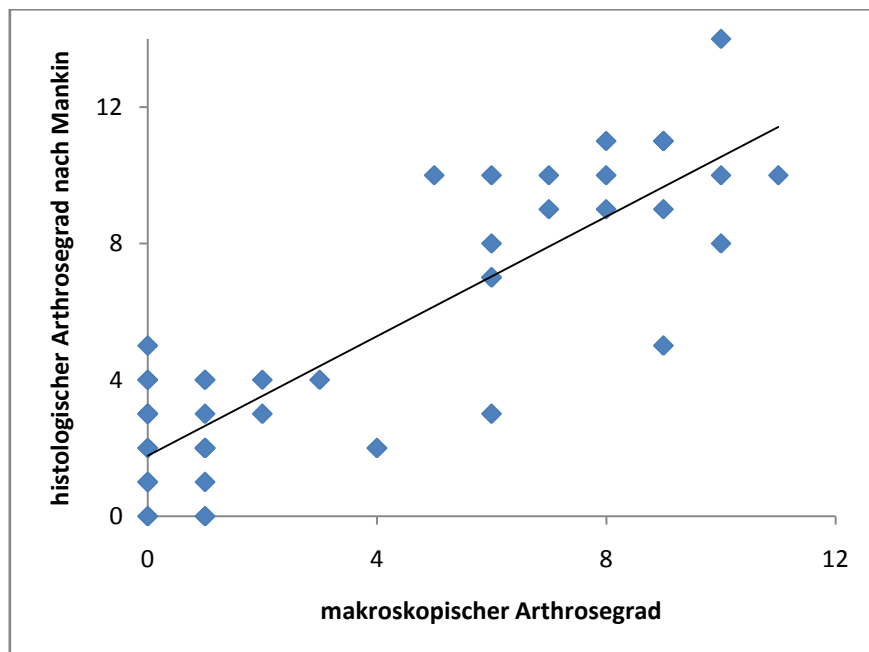
In der Gruppe nach Scheinoperation liegt der Mittelwert nach 3 Wochen bei  $3,25 \pm 0,71$ , nach 6 Wochen bei  $1,00 \pm 1,20$  und nach 12 Wochen bei  $2,25 \pm 1,17$ .

Im Vergleich dazu zeigen die Gelenke der Versuchsgruppe nach 3 Wochen bereits einen mittleren histologischen Arthrosegrade von  $7,25 \pm 3,62$ , nach 6 Wochen  $8,00 \pm 2,88$  und nach 12 Wochen steigt der Wert auf  $9,83 \pm 3,06$ . In dieser Gruppe korreliert die Steigung des histologischen Arthrosegrades mit der zunehmenden Zeit in Wochen nach Kreuzbandresektion (siehe Abbildung 20).

Zudem lässt sich eine positive Korrelation feststellen, dass bei einem hohen histologischen Arthrosegrad auch ein hoher makroskopischer Arthrosegrad besteht. Es existiert eine signifikant positive Korrelation ( $r = 0,857$ ;  $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 21).

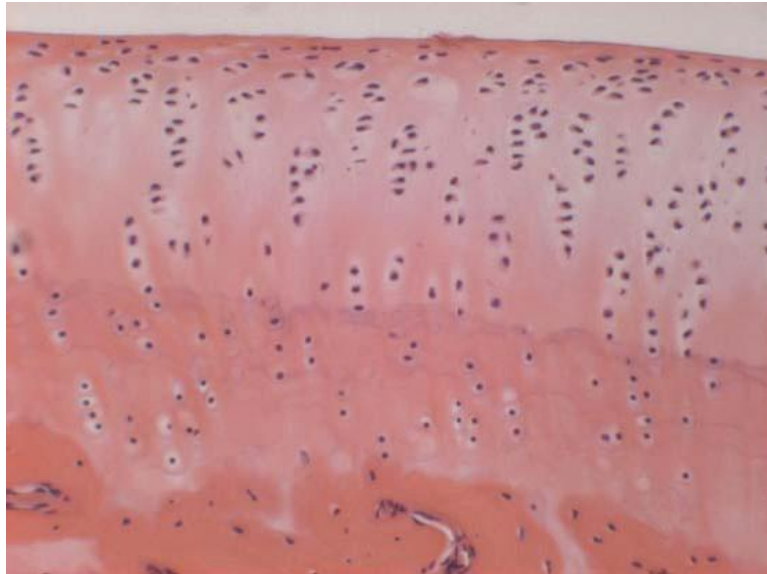


**Abbildung 20:** Vergleich des histologischen Arthrosegades nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation



**Abbildung 21:** Korrelation zwischen makroskopischem und histologischem Arthrosegrad

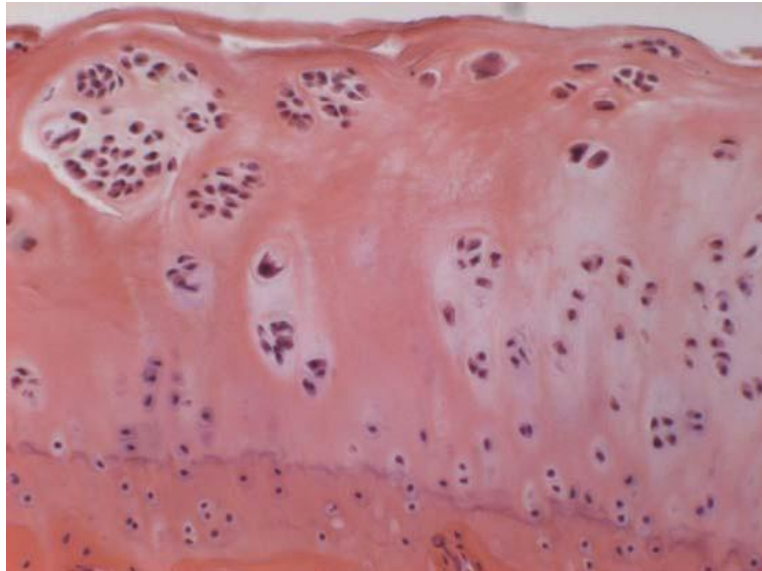




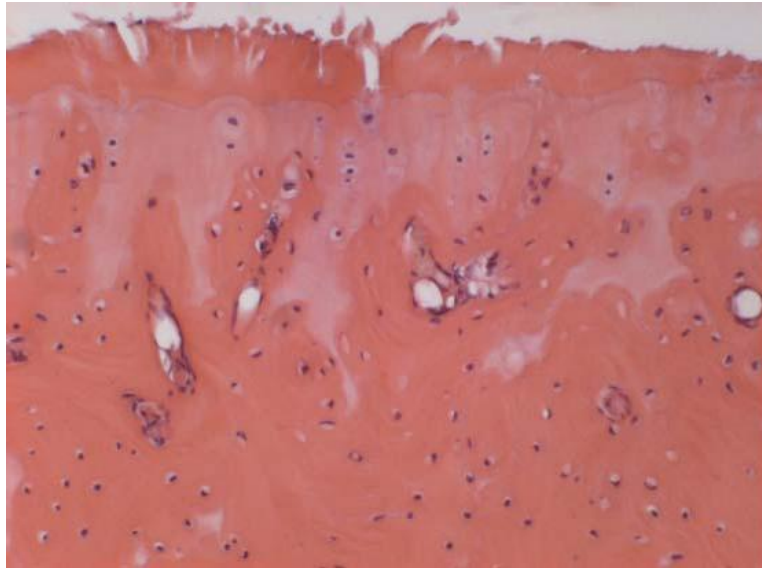
**Abbildung 22:** Histologisches Bild eines intakten Knorpels eines nicht operierten Tieres



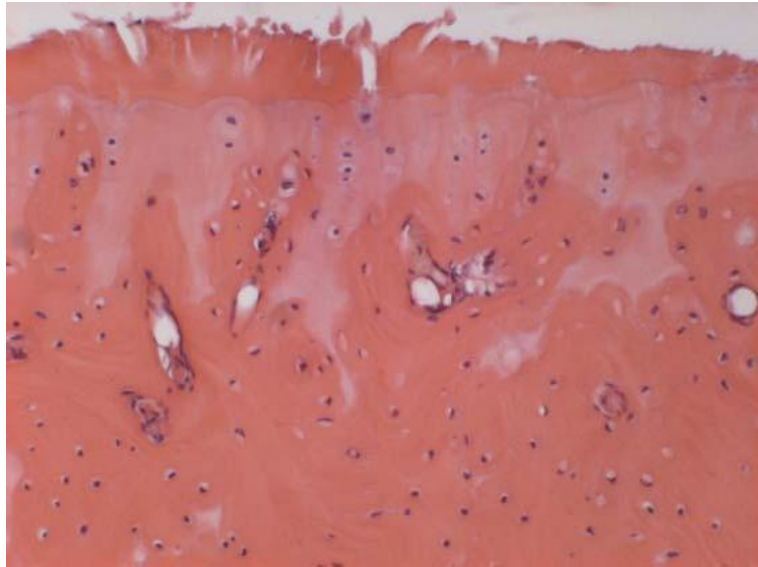
**Abbildung 23:** Beginnende Zerstörung der Knorpelstruktur  
(3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



**Abbildung 24:** Vollständige Aufhebung der Knorpelarchitektur mit Rissbildung und Knorpelzell-Clustern ( 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



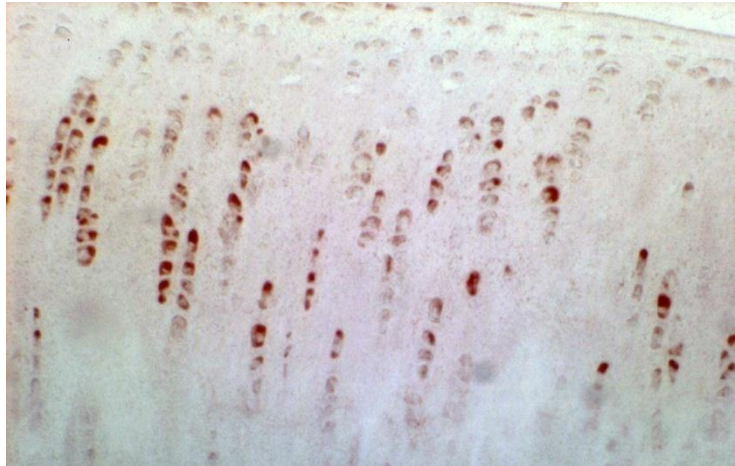
**Abbildung 25:** Tiefe Rissbildung und Zerstörung der Knorpeloberfläche (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



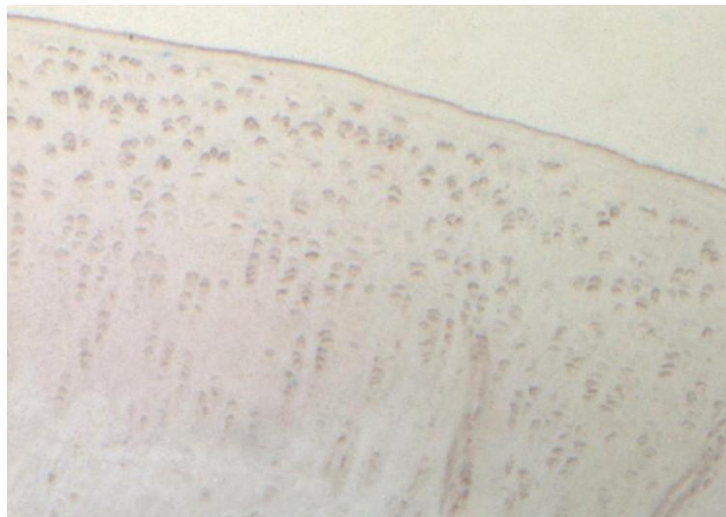
**Abbildung 26:** Vollständiger Verlust des Knorpels bis auf einen schmalen, noch verbliebenen Randsaum

### 3.5 Immunhistochemische Färbung von PTH1R

Zu jeder immunhistochemischen Färbung wurde eine Kontrollfärbung angefertigt. Keine der Kontrollfärbungen wies eine spezifische Anfärbung von Zellen oder des Hintergrundes auf (siehe Abbildung 27 und 28).



**Abbildung 27:** Immunhistochemische Anfärbung von PTH1R



**Abbildung 28:** Kontrolle der immunhistochemischen Anfärbung von PTH1R

### 3.5.1 Nachweis von PTH1R

In den Proben aller drei Untersuchungsgruppen konnte der PTH/PTHrP-Rezeptor auf der Oberfläche von Chondrozyten nachgewiesen werden.

In der Kontrollgruppe liegt der durchschnittliche Anteil an PTH1R-positiven Knorpelzellen bei 30,85 %  $\pm$  13,14 %. In der Vergleichsgruppe zeigte sich nach 3 Wochen ein durchschnittliches Vorkommen von PTH1R-positiven Zellen von 21,11 %  $\pm$  18,30 %, nach 6 Wochen lag der Anteil bei 33,90 %  $\pm$  12,47 %, und nach 12 Wochen ließen sich 30,53 %  $\pm$  8,89 % PTH1R-positive Knorpelzellen anfärben.

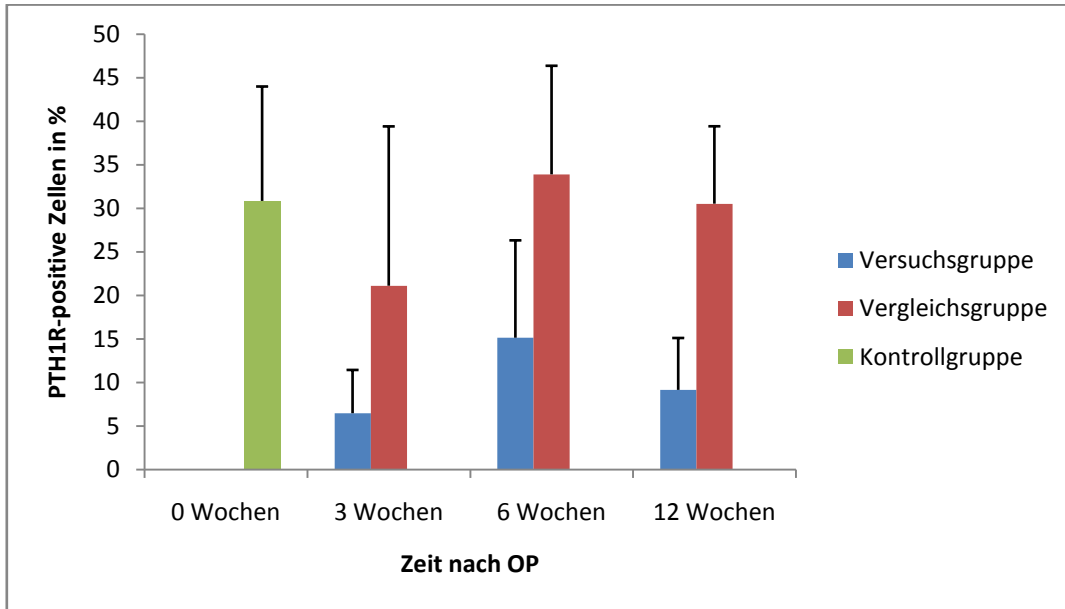
Nach Kreuzbanddurchtrennung sind nach 3 Wochen durchschnittlich 6,47 %  $\pm$  4,97 % der Zellen PTH1R-positiv, nach 6 Wochen liegt das Ausmaß bei 15,14 %  $\pm$  11,18 % und nach 12 Wochen zeigt sich ein Anteil von 9,15 %  $\pm$  5,96 % (siehe Abbildung 29).

Nach 3 Wochen besteht noch kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchsgruppe und Vergleichsgruppe ( $p = 0,059$ ). 6 Wochen nach Versuchsbeginn zeigt sich allerdings bereits, dass der prozentuale Anteil PTH1R-positiver Chondrozyten in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung signifikant niedriger ist als in der Gruppe nach Scheinoperation ( $p < 0,05$ ). Nach 12 Wochen ist dieser Unterschied dann hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich der Mittelwerte von PTH1R-positiven Zellen zwischen Versuchsgruppe und der Gruppe der nicht operierten Tiere zeigen sich im gesamten Versuchsverlauf signifikant niedrigere Werte in der Versuchsgruppe. Dieser Unterschied ist nach 3 und 12 Wochen hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) und nach 6 Wochen signifikant ( $p < 0,05$ ).

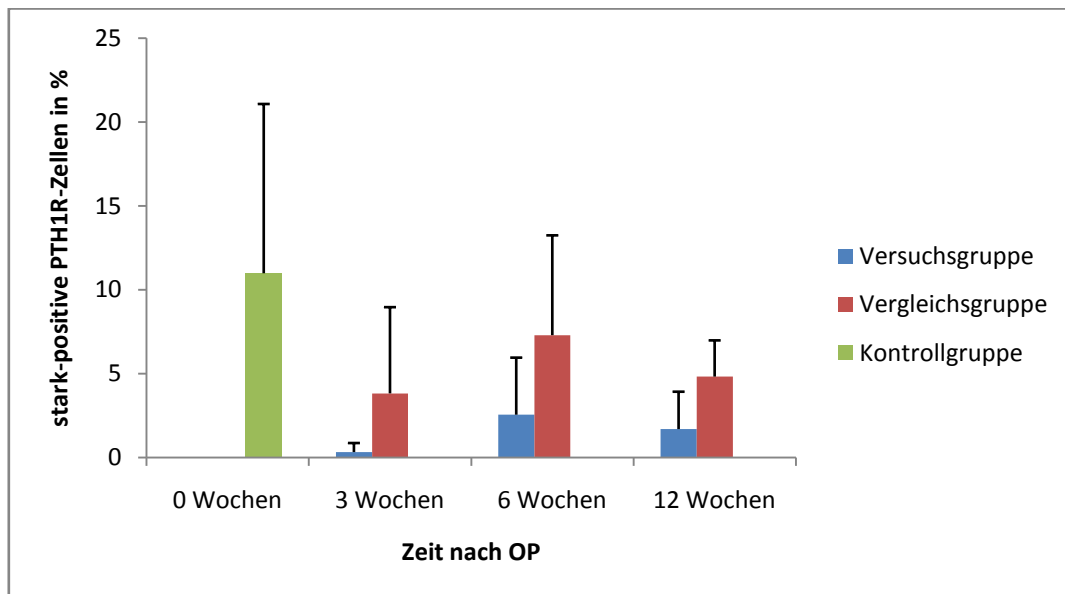
In der Diskriminierung der gefärbten Zellen zwischen stark und einfach gefärbten Zellen konnten die angeführten Ergebnisse bestätigt werden (siehe Abbildungen 30 und 31).

In Bezug auf den histologischen Arthrosegrad nach Mankin lässt sich feststellen, dass bei einem hohen histologischen Arthrosegrad ein niedriger Anteil an PTH1R-positiven Chondrozyten nachweisbar ist. Es besteht eine signifikante, negative Korrelation ( $r = -0,601$ ;  $p < 0,001$ ). Ebenso besteht eine signifikante, negative Korrelation zwischen PTH1R-Rezeptordichte und

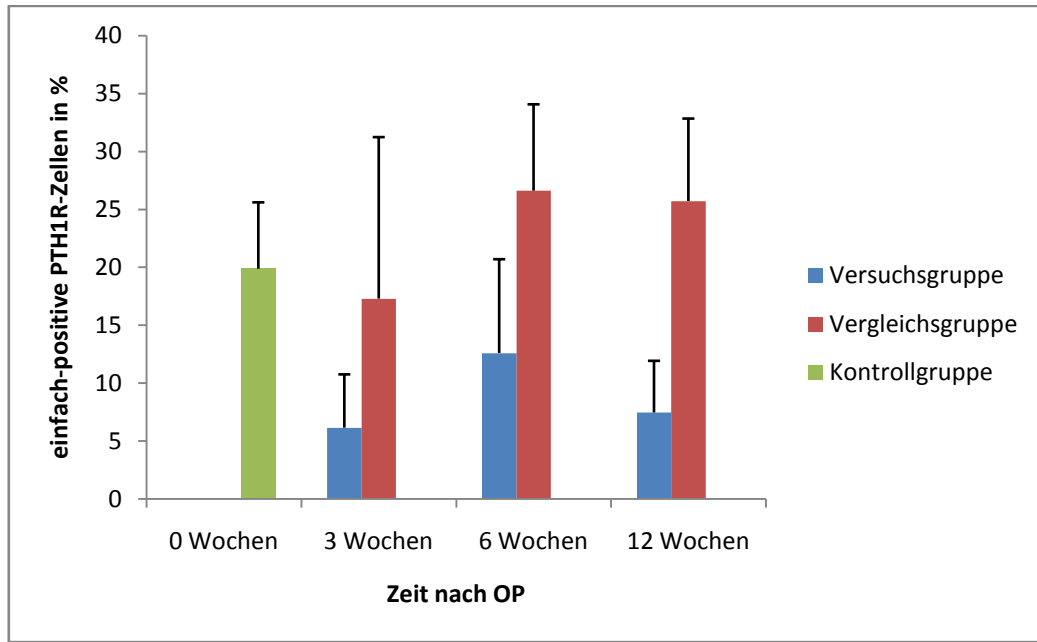
makroskopischem Arthrosegrad ( $r = -0,541$ ;  $p < 0,001$ ) (siehe Abbildungen 32 und 33).



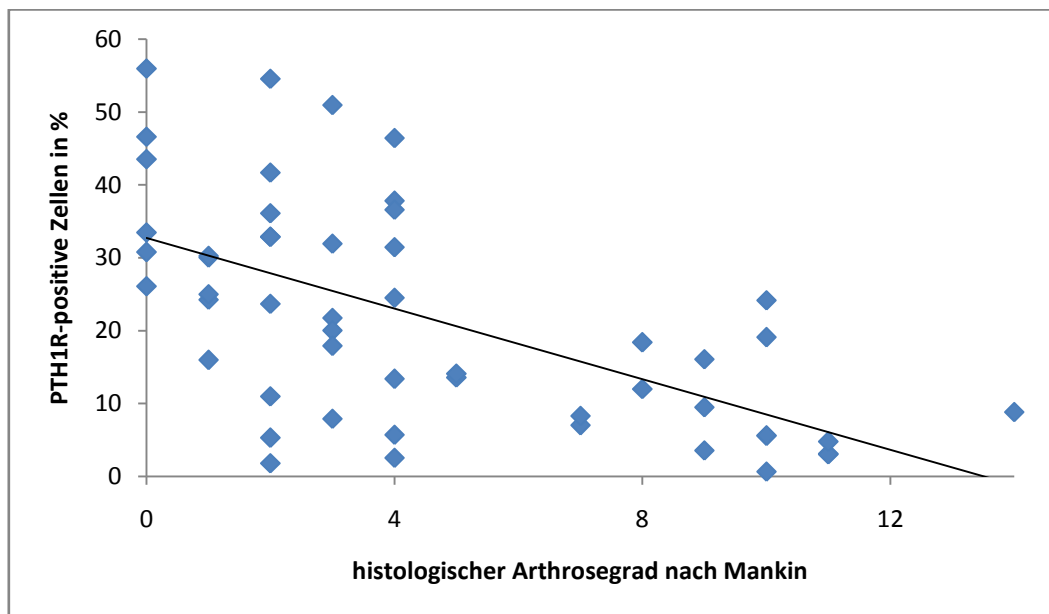
**Abbildung 29:** Vergleich der PTH1R-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation im zeitlichen Verlauf



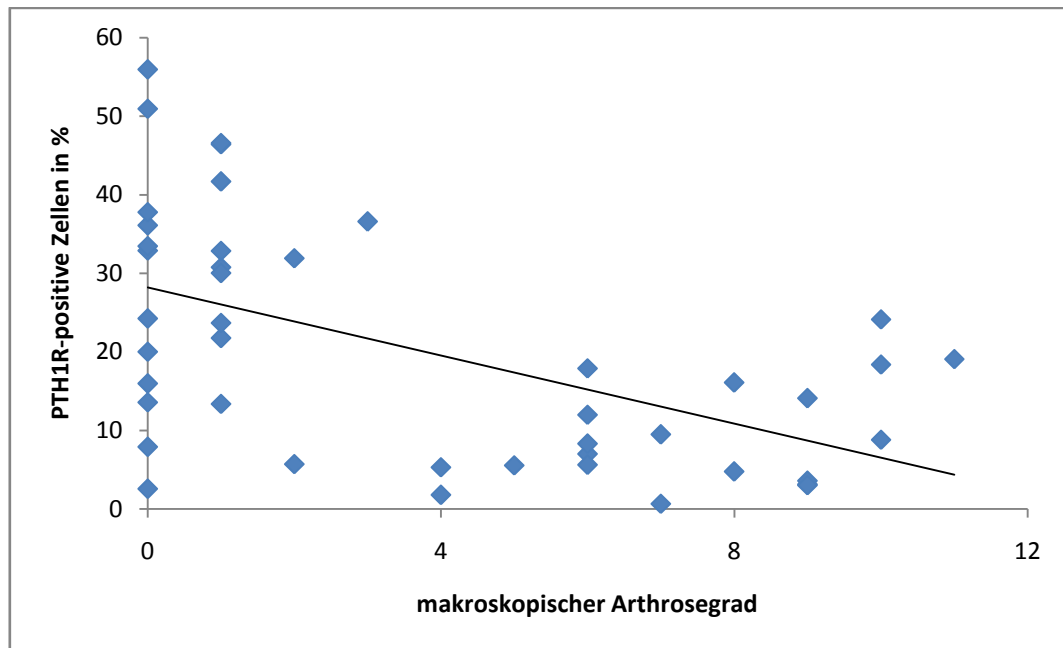
**Abbildung 30:** PTH1R-stark-positive Chondrozyten nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation im zeitlichen Verlauf



**Abbildung 31:** PTH1R-einfach-positive Chondrozyten nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation im zeitlichen Verlauf



**Abbildung 32:** Korrelation histologischer Arthrosegrad nach Mankin und PTH1R-Expression

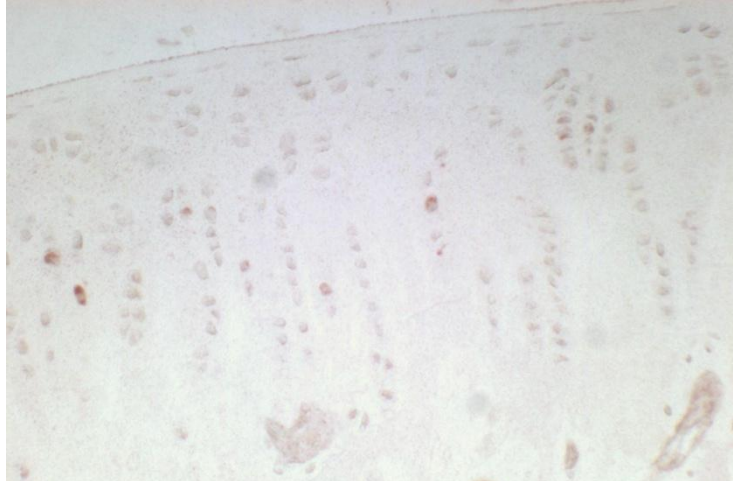


**Abbildung 33:** Korrelation makroskopischer Arthrosegrad und PTH1R-Expression

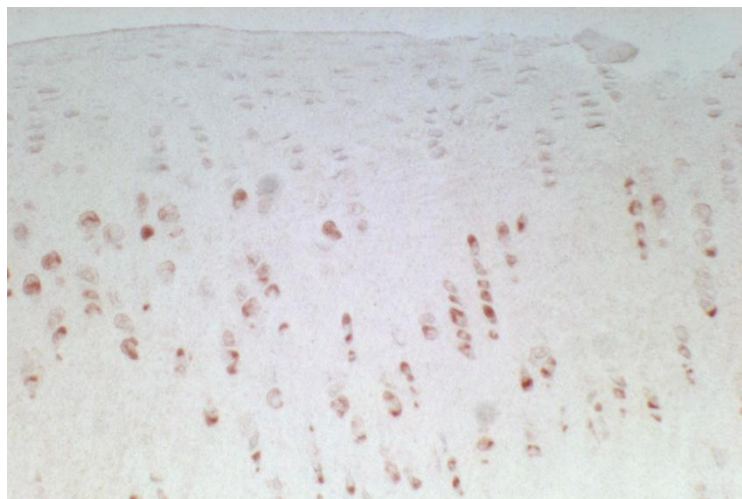


Immunhistochemische Bilder

3 Wochen nach Operation

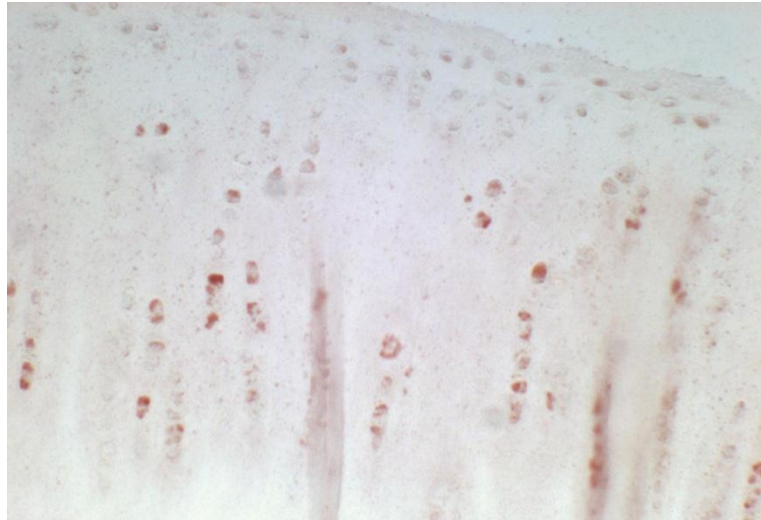


**Abbildung 34:** PTH1R-Expression 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

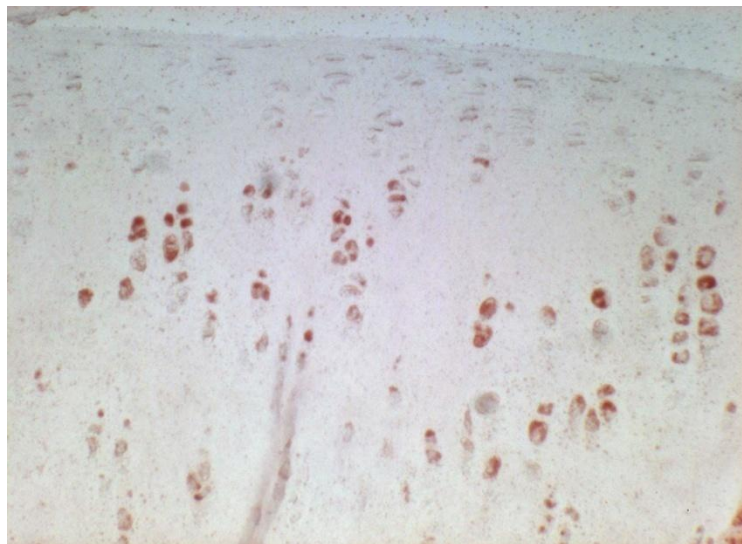


**Abbildung 35:** PTH1R-Expression 3 Wochen nach Scheinoperation

6 Wochen nach Operation

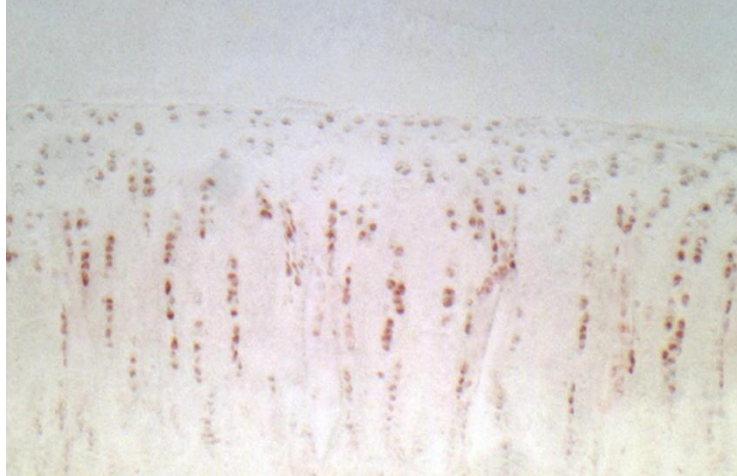


**Abbildung 36:** PTH1R-Expression 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

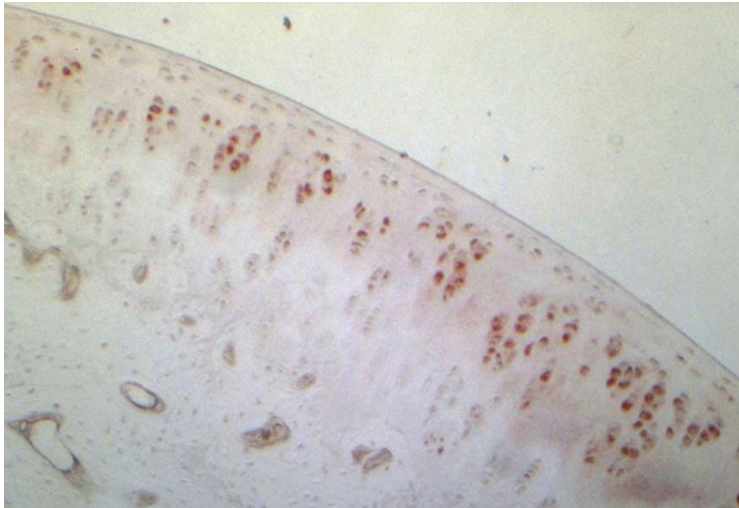


**Abbildung 37:** PTH1R-Expression 6 Wochen nach Scheinoperation

12 Wochen nach Operation



**Abbildung 38:** PTH1R-Expression 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 39:** PTH1R-Expression 12 Wochen nach Scheinoperation

### 3.6 Regionale Verteilung von PTH1R

Bei der Untersuchung der gefärbten Proben fiel auf, dass PTH1R fast ausschließlich auf Chondrozyten der Transitional- und Radiärzone des Gelenkknorpels exprimiert wird. In sehr seltenen Fällen konnten die Rezeptoren auch auf Chondrozyten der Tangentialzone aufgefunden werden.

### 3.7 PTH1R in der Membrana synovialis

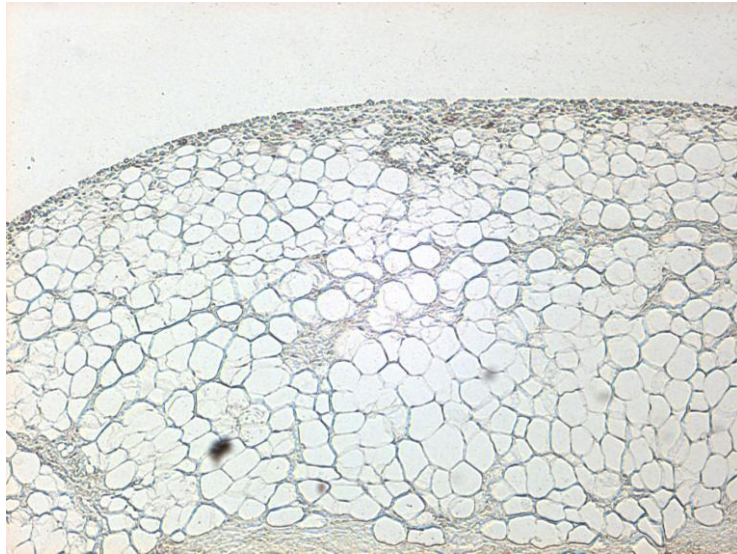
Wie bei den Knorpelproben wurde auch bei den Synovialisproben eine Kontrollfärbung zu jeder immunhistochemischen Färbung angefertigt. Keine der Kontrollfärbungen zeigte eine spezifische Anfärbung von Zellen oder des Hintergrundes.

Die folgenden Abbildungen zeigen eine immunhistochemische Färbung einer Synovialisprobe und der dazugehörigen Kontrolle.



**Abbildung 40:** Immunhistochemische Anfärbung von PTH1R





**Abbildung 41:** Kontrolle der immunhistochemischen Färbung von PTH1R

Wie bereits erwähnt, konnte eine quantitative Auszählung der immunhistochemisch gefärbten Synovialisproben aufgrund verschiedener Ursachen nicht durchgeführt werden. Zum einen waren die angefärbten Zellen nicht eindeutig voneinander abgrenzbar und entzogen sich somit einer greifbaren Zählung. Zum anderen wiesen einige entnommene Proben keine Synovialmembran auf, so dass nur eine ungenügende Stichprobenanzahl zustande gekommen wäre, um eine valide Aussage treffen zu können. Infolgedessen beschränkt sich diese Studie bezüglich der Expression des PTH1R in der Membrana synovialis auf eine Trendaussage, um keine fälschlichen und irreführenden Ergebnisse zu präsentieren.

Den 54 Gelenken wurde im Rahmen dieser Studie jeweils etwas Gelenkinnenhaut entnommen und immunhistochemisch angefärbt. Bei 19 Proben ließ sich weder in der HE noch in der immunhistochemischen Färbung eine Deckzellschicht der Membrana synovialis erkennen, so dass sie bei der weiteren Betrachtung außer Acht gelassen wurden. Die restlichen 35 Proben zeigten das typische, perlenschnurartige Aussehen der Membrana synovialis. Unabhängig von Gruppe oder Versuchsdauer wiesen alle Synovialisproben nach immunhistochemischer Behandlung mit markiertem PTH1R-Antikörper

eine deutliche Färbung auf. Somit zeigten alle Proben, die eine Membrana synovialis enthielten, eine Anfärbung ihrer Synovialozyten. Auffällig war, dass in der Gruppe nach Kreuzbandresektion die Membrana synovialis aus einer mehrzelligen Schicht von Synovialozyten bestand, wohingegen sie sich in der Gruppe nach Scheinoperation vorwiegend einschichtig darstellte. Des Weiteren ließ sich in der Gruppe nach Scheinoperation ein erhöhter Anteil an Fettzellen in der Membrana synovialis erkennen, die bei der überwiegenden Mehrheit der Proben nach Kreuzbanddurchtrennung fehlte.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methodik**

Die Erforschung der Frühphasen der Arthrose ist beim Menschen schwierig und nur unter Einschränkungen möglich. Daher eignet sich das Tiermodell sehr gut, um die beginnende Arthrose und ihren Verlauf zu untersuchen und ist in der Forschung ein gängiges Mittel der Wahl. Die Entscheidung bei der Wahl der Spezies fiel auf das Neuseelandkaninchen. Zum einen hat es sich bereits in vorangegangenen Studien zur Arthrose als Modell bewährt [39, 123]. Zum anderen liefert es im Vergleich zu Mäusen oder Ratten ausreichend Knorpelgewebe für umfangreiche Untersuchungen. In Relation zu Hunden, Schafen oder Schweinen zeichnen sich die Kaninchen überdies durch eine kostengünstigere Haltung und Fütterung aus.

Um eine Arthrose zu induzieren gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist die Induktion mittels chemischer Substanzen wie Papain, Zymokin, Monoiodacetat oder Interleukin- $\beta$ , die direkt ins Gelenk injiziert werden und somit auf chemischem Weg eine Arthrose auslösen [46, 56]. Problematisch bei dieser Methode ist, dass sie keineswegs dem menschlichen Verlauf einer Arthrose nahe kommt, und zudem die chemischen Noxen einen nicht kalkulierbaren Einfluss auf die biochemische Zielgröße PTH1R haben könnten. Demzufolge wurde die mechanische Arthroseinduktion als bewährte Methode für diesen Versuch ausgewählt. Die Bandbreite, auf welche Art und Weise eine mechanisch induzierte Arthrose herbeigeführt werden kann, ist sehr groß. Die Literatur bietet dazu viele Modelle, die von der direkten Knorpelzerstörung mittels Skalpell, über Immobilisation und Denervierung des Gelenkes bis zu Destabilisierung reichen [70, 84, 126, 127]. Von diesen unterschiedlichen Methoden kommt die der Destabilisierung des Gelenkes dem Verlauf einer Arthrose beim Menschen am nächsten, so dass die Wahl auf diese Art der Induktion fiel. Sie simuliert zwar nur den Anteil der sekundär posttraumatischen Arthrose, für die Simulation einer primären Arthrose kann jedoch kein Modell gefunden werden. Eine Destabilisierung des Gelenkes kann auf verschiedenen Wegen herbeigeführt werden. Dazu zählen die partielle oder

vollständige Meniskektomie eines oder beider Menisken, die Resektion eines oder beider Kreuzbänder, die Resektion der Kollateralbänder oder eine Kombination der genannten Verfahren [7, 39, 47, 94, 134].

Unterschiede zwischen den genannten Behandlungsweisen werden im Ausmaß ihrer arthrotischen Veränderung und ihrem zeitlichen Eintreffen nach der Operation deutlich. In dieser Studie wurde die einfache Resektion des vorderen Kreuzbandes angewendet. Durch diese Methode, die vergleichsweise einfach durchzuführen ist, entstehen aufgrund des relativ geringen Blutungs- und Entzündungsrisikos keine unerwünschten Kontrakturen, die dem Gelenk wieder mehr Stabilität verleihen könnten. Außerdem ist es ein häufig auftretendes Verletzungsmuster beim Menschen, das in Abhängigkeit von Alter und Gewicht im Laufe der Zeit sehr häufig zur Gonarthrose führt [101].

Des Weiteren haben vorangegangene Studien den Vorteil der Resektion des vorderen Kreuzbandes zur mechanischen Induktion einer Arthrose erwiesen, da diese Methode relativ zeitnah ausgeprägte Befunde einer progredienten Arthrose auf beiden Femurkondylen zeigt [47, 94, 134, 147]. Somit ist dies eine bewährte Methode und fand bereits vielfache Anwendung in der Arthroreforschung.

### **4.1.2 Probenentnahme**

Auch wenn die Druckverteilung im menschlichen Kniegelenk durch verschiedene Strukturen relativ gleichmäßig gestaltet wird, so gibt es doch Prädispositionsstellen für das Entstehen einer Knorpelschädigung [118]. Bei einer Untersuchung verschiedener Areale von menschlichen Hüftköpfen mit degenerativen Veränderungen zeigten sich große Unterschiede des Arthrosegades innerhalb eines Gelenkes [76].

In einer Studie an Femurkondylen von Neuseelandkaninchen nach Resektion des vorderen Kreuzbandes konnten Chang et al. nachweisen, dass degenerative Veränderungen im Knorpel des medialen Kondylus am häufigsten und am ausgeprägtesten zu finden sind [20].

Aus diesen Überlegungen heraus und um eine möglichst sinnvolle und aussagekräftige Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde für diese Studie jeweils der



mediale Femurkondylus für die Anfertigung der histologischen Schnitte entnommen. Dadurch konnte die Untersuchung des immer gleichen Areals sicher gestellt werden.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Arthroseentstehung nach Kreuzbanddurchtrennung**

Das gewählte Modell eignet sich sehr gut, um progrediente, arthrotische Veränderungen des Knorpels herbeizuführen, die mit denen im Verlauf einer Arthrose beim Menschen gut zu vergleichen sind. Nach makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung der Gelenke, zeigten bereits 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung 6 von 8 Gelenken deutliche Anzeichen einer Arthrose. 12 Wochen nach der Operation präsentierten alle untersuchten Gelenke Knorpelverluste und tiefe, bis auf den subchondralen Knochen reichende Defekte. Eine verstärkte Bildung osteophytärer Anbauten sowie die Zunahme der Ergussmenge in den Gelenken zeigen unter anderem den progredienten Charakter der induzierten Arthrose. Zudem offenbarte sich ein fortschreitender Verlust an Proteoglykanen und eine Veränderung der Chondrozyten. Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den Angaben vorrausgegangener Studien [20, 134].

Die Gelenke der Vergleichs- und Kontrollgruppe hingegen zeigen, sowohl makroskopisch als auch histologisch, nur geringe Anzeichen einer Arthrose, die sich im Versuchsverlauf als nicht progredient darstellten. Die Arthrosegrade der Kontrolltiere und der Tiere nach Scheinoperation entsprachen sich weitgehend, so dass von einer Einflussnahme auf die Arthrosebildung durch das alleinige Eröffnen des Gelenkes nicht ausgegangen werden kann. Die degenerativen Veränderungen, die vereinzelt festgestellt wurden, sind demnach wohl eher auf spontan auftretende Veränderungen zurückzuführen. Bei der Untersuchung der Gelenke der Vergleichsgruppe zeigten sich in 50 % der Fälle sowohl makroskopisch als auch histologisch keine Anzeichen einer Arthrose, und bei keinem Gelenk wurde ein Arthrosegrad über 4 erhoben (Score nach Mankin).

Die Progredienz der Arthrose lässt sich anhand der Ergebnisse der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung deutlich ablesen. Die Varianz in dieser Gruppe war allerdings hoch. So waren die histologischen Arthrosegrade nach 3 Wochen insgesamt bereits hoch, 1 Gelenk zeigte sogar einen sehr hohen Arthrosegrad, und nach 12 Wochen traten auch relativ niedrige Arthrosegrade auf. Derartige Abweichungen im selben Untersuchungszeitraum beschrieben bereits Vignon et al. in ihrer Arthrostudie am Kaninchenmodell im Jahre 1987 [134]. Erklärungen für dieses Phänomen gibt es mehrere. Zum einen gibt es interindividuelle Unterschiede in Bezug auf postoperative Gewichtszunahme sowie Bewegung und Belastung des Kniegelenkes. Zum anderen könnte eine gewisse genetische Disposition zur Ausbildung einer Arthrose, die beim Menschen angenommen wird, auch beim Kaninchen bestehen. Zudem zeigte eine Studie an degenerativ veränderten Femurköpfen beim Menschen, dass bezogen auf Zeichen der Knorpeldegeneration, große Unterschiede bereits in verschiedenen Arealen desselben Gelenkes bestehen [76]. Aufgrund dieser Tatsache könnte die Entnahme nur eines Areals eine größere Varianz der Ergebnisse nach sich ziehen. Um eine Fehlinterpretation diesbezüglich auszuschließen, wurde der Korrelationskoeffizient zwischen makroskopischem und histologischem Arthrosegrad bestimmt. Es zeigt sich eine signifikante, positive Korrelation. Aufgrund dieser Korrelation kann man davon ausgehen, dass die hier angestellte histologische Auswertung als repräsentativ zu werten ist.

### **4.2.2 PTH1R**

Die vorliegende Studie untersucht erstmals die Expression des gemeinsamen Rezeptors von PTH und PTHrP im Kaninchenkniegelenk nach experimentell induzierter Arthrose im zeitlichen Verlauf. Durch vorangegangene Studien konnte die Vermutung einer Beteiligung von PTHrP und seines Rezeptors an der Pathogenese der Arthrose erhärtet werden. Als Kohno et al. 1997 erhöhte PTHrP-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit OA und RA feststellen konnten, wurde erstmals der Verdacht erhoben werden, dass PTHrP am Entzündungsprozess sowohl bei Osteoarthrose als auch bei rheumatoider

Arthritis beteiligt ist. Sie stellten fest, dass bei entzündlichen Prozessen PTHrP von Synovialozyten gebildet und an die Synovialflüssigkeit abgegeben wird [66]. Spätere Studien konnten diese Ergebnisse bestätigen und fanden durch vergleichende Analysen höhere Konzentrationen an PTHrP bei RA und bei OA sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im synovialen Gewebe [37, 54, 146]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass hohe PTHrP-Spiegel in der Synovialflüssigkeit auf die entzündliche Aktivität sowohl bei Osteoarthritis als auch bei der rheumatoiden Arthritis schließen lassen könnten. Der Einfluss dieses Proteins auf den Gelenkknorpel allerdings blieb weitgehend ungeklärt. Eine Untersuchung von Hüftkopfknochen von Patienten mit fortgeschrittener, degenerativer Arthritis sowie von Patienten mit rheumatoider Arthritis ergab, dass PTHrP vorwiegend im Knochen mit degenerativen Läsionen zu finden war, und die Expression deutlich vom Grad der Degeneration abhing. Die Expression im Knochen mit entzündlicher Arthritis war entschieden geringer [91]. Terkeltaub et al. bestätigten die erhöhte Expression von PTHrP in arthrotischem Knochen. Sie untersuchten ebenfalls den PTH/PTHrP-Rezeptor und konnten seine Expression sowohl auf normalen als auch auf degenerativ veränderten Chondrozyten nachweisen. Die Forscher konnten feststellen, dass in gesundem Knochen ein diffuses Verteilungsmuster des PTH1R vorherrscht, wohingegen die Verteilung des Rezeptors in arthrotisch verändertem Knochen relativ strikt auf die Knochenoberfläche beschränkt blieb. Zudem zeigte sich in dieser Studie, dass der PTH1R in arthrotischem Knochen im Vergleich zu gesundem Knochen nur von wenigen Zellen exprimiert wurde [124].

Die vorliegende Studie richtet nun sein Augenmerk auf die PTH1R-Expression in der Frühphase der Entstehung einer Arthritis und seinen Verlauf. In den immunhistochemischen Färbungen von PTH1R zeigte sich dabei eine deutliche Anfärbung der Zellmembran und eine meist etwas schwächere Färbung des Zellinneren der Knochenzellen. Die meisten Proben wiesen sowohl PTH1R-positive, als auch PTH1R-negative Chondrozyten auf. Diese Färbeargebnisse entsprechen den histologischen Bildern vorangegangener Studien mit Färbung von PTH1R [124]. Im Rahmen dieser Studie konnten innerhalb der drei Untersuchungsgruppen interindividuelle Unterschiede bezüglich der PTH1R-

Expression festgestellt werden. Außerdem fielen auch innerhalb einzelner Proben regionale Unterschiede auf. Derartige Abweichungen innerhalb eines Gelenkes zeigten sich bereits in einer Studie von Mankin et al. Sie deckten bei ihrer Untersuchung an humanen Femurköpfen große Unterschiede innerhalb eines Gelenkes bezüglich der histologischen und biochemischen Zeichen der Knorpeldegeneration auf, welche besonders bei Gelenken mit weit fortgeschrittener Arthrose evident waren [76].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass PTH1R sowohl in gesundem als auch in degenerativ verändertem Knorpel vorhanden ist. In allen Proben mit normalem Knorpel war PTH1R in relativ hoher Konzentration nachweisbar, wohingegen bei Proben mit fortgeschrittener Knorpelzerstörung keine oder nur eine sehr geringe Expression von PTH1R festzustellen war. Dies verdeutlicht, dass PTH1R an physiologischen Vorgängen im Knorpel beteiligt ist, aber auch an den Stoffwechselvorgängen im Verlauf einer Osteoarthrose Anteil hat. Im Vergleich der Versuchs- mit der Vergleichsgruppe lässt sich eine unterschiedliche PTH1R-Expression feststellen. Der Unterschied nach 3 Wochen ist deutlich, jedoch noch nicht signifikant, was vermutlich mit der relativ großen Streuung der Ergebnisse innerhalb dieser Gruppe zusammenhängt. Nach 6 und 12 Wochen zeigt sich allerdings eine signifikant niedrigere PTH1R-Expression in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung verglichen mit den Tieren nach Scheinoperation. Dies lässt vermuten, dass sich erst im Verlauf einer Arthrose eine verminderte PTH1R-Expression im arthrotischen Knorpel einstellt. Der Anteil an PTH1R-positiven Zellen ist in der Versuchsgruppe nach 3, 6 und 12 Wochen signifikant niedriger als in der Gruppe der nicht operierten Tiere. Diese eindrucksvolle Feststellung lässt darauf schließen, dass die arthrotischen Veränderungen im Knorpel und die PTH1R-Expression auf Chondrozyten sich gegenseitig bedingen. Dementsprechend verursacht entweder die zunehmende Knorpelzerstörung eine Abnahme der Rezeptordichte im Gelenkknorpel oder umgekehrt. Es besteht darüber hinaus eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors und dem histologischen Arthrosegrad nach Mankin. Ebenso signifikant verhält sich die Korrelation zwischen der PTH1R-Expression

und dem makroskopischen Arthrosegrad. Das bedeutet, bei einem hohen, sowohl histologischen als auch makroskopischen, Arthrosegrad präsentiert sich eine vergleichsweise geringe Expression von PTH1R. Diese deutlichen Ergebnisse zeigen eine enge Assoziation der Rezeptorexpression mit den degenerativen Veränderungen im Knorpel. Somit könnte die PTH1R-Expression auf Chondrozyten einen potentiellen Marker degenerativer Veränderungen des Gelenkknorpels darstellen.

Bei der Untersuchung der Proben konnte festgestellt werden, dass PTH1R-positive Zellen fast ausschließlich in der Transitional- und Radiärzone zu finden waren. Zu einem abweichenden Ergebnis kamen Terkeltaub et al., die die Rezeptoren vornehmlich in den oberflächennahen Gebieten des Knorpels von humanen Kniegelenken mit fortgeschrittener Arthrose ausmachten. Vorangegangene Studien, die den Gehalt an Granula, Zellvakuolen und Vesikeln in Chondrozyten des Gelenkknorpels betrachteten, konnten diesbezüglich eine geringe Ausprägung in der Tangentialzone und eine starke Ausprägung in der Radiärzone feststellen. Dementsprechend wird in der Radiärzone die höchste Stoffwechselaktivität angenommen [143]. Die in der vorliegenden Studie festgestellte erhöhte Dichte PTH1R-positiver Chondrozyten in der Transitional- und Radiärzone könnte auf die vermehrte Stoffwechselaktivität zurückzuführen sein. In Anbetracht der von Terkeltaub et al. festgestellten diffusen PTH1R-Verteilung in gesundem GK wäre demnach der PTH1R fokal am Stoffwechsel des arthrotischen Gelenkknorpels beteiligt.

Terkeltaub und seine Mitarbeiter stellten ebenso fest, dass nur eine Minderheit der Knorpelzellen bei fortgeschrittener Arthrose den PTH1-Rezeptor exprimieren [124]. Diese verminderte Rezeptorexpression bei Arthrose zeigt sich auch bei dieser gegenwärtigen, tierexperimentellen Untersuchung.

In den vergangenen Jahren beschäftigten sich einige Forscher mit dem Einfluss subchondraler Osteoblasten auf den darüber liegenden Knorpel. Seit der Kenntnis von Verbindungen zwischen subchondralem Knochen und Gelenkknorpel in Form von Mikrorissen, Gefäßkanälchen und Gefäßneubildungen wurde vermutet, es könne von Osteoblasten gebildete Mediatoren geben, die eine Veränderung der Chondrozyten herbeiführen

können [142]. Durch verschiedene Studien an Osteoblasten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Phänotyp als auch Sekretion bei arthrotischen und normalen Osteoblasten unterschiedlich sind. So gilt als gesichert, dass die Sekretion von beispielsweise IL-6, TGF- $\beta$ , IGF-1, Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und Prostaglandin E2 bei arthrotischen Osteoblasten gesteigert ist [50, 80, 105].

Sanchez et al. stellten die Hypothese auf, dass osteoarthrotische Osteoblasten zur subchondralen Sklerosierung und zur Degradation des darüber liegenden Knorpels führen. Sie untersuchten in ihrer Studie von 2005 den Einfluss subchondraler Osteoblasten auf Knorpelzellen von Patienten mit fortgeschrittener Arthrose. Dabei wurde zwischen Osteoblasten aus sklerosierten Zonen (SC) des subchondralen Knochens und Zellen aus nichtsklerosierten Zonen (N) unterschieden. Die Forscher fanden heraus, dass SC-Osteoblasten die Expression von PTHrP und PTH1R auf arthrotischen Chondrozyten herabsetzten, wohingegen N-Osteoblasten die Expression beider Proteine steigerten. Des Weiteren konnten sie auch erstmals eine Veränderung in der Genexpression nachweisen. Sie stellten eine Downregulation der PTH1R-mRNA in Chondrozyten fest, die durch SC-Osteoblasten, nicht aber durch N-Osteoblasten induziert wurde. Dabei wurde die Rezeptor-mRNA in Kultur mit N-Osteoblasten um 23 % angehoben ( $p < 0,05$ ), aber durch Kultur mit SC-Osteoblasten um 37 % vermindert ( $p < 0,001$ ). Die Expression von PTHrP-mRNA in Chondrozyten wurde durch N-Osteoblasten um das 21-fache gesteigert, während es durch die Inkubation mit SC-Osteoblasten 4-fach gehemmt wurde [106]. Sanchez et al. demonstrierten durch ihre Arbeit, dass SC-Osteoblasten eine Veränderung der Morphologie von OA-Chondrozyten zu einem hypertrophen Phänotyp und eine nachfolgende Mineralisierung der Matrix herbeiführen können [106]. Wie oben bereits erwähnt, wurde bei arthrotischen Osteoblasten eine vermehrte Sekretion von TGF- $\beta$  festgestellt. Tsukazaki et al. konnten 1995 bei einer Betrachtung von Knorpelgewebe von Ratten feststellen, dass TGF- $\beta$  die Expression von PTHrP-mRNA stimuliert, gleichzeitig aber eine Downregulation der Rezeptor-mRNA veranlasst [128]. Die in dieser Studie festgestellte Abnahme der PTH1R-Dichte im arthrotischen

Gelenkknorpel kann demnach auch durch den Einfluss sklerosierter, subchondraler Osteoblasten mit herbeigeführt worden sein.

PTHrP stellt in Verbindung mit seinem Rezeptor bei der endochondralen Ossifikation einen negativen Feedback-Mechanismus dar, der die Differenzierung von prähypertrophen hin zu hypertrophen Chondrozyten inhibiert und zusätzlich die Apoptose hemmt. Osteoarthritis geht mit Knorpelzellhypertrophie und Zellverlust sowie mit einer anormalen Mineralisierung der Matrix und verstärktem subchondralem Knochenwachstum einher. In Studien mit PTHrP-defizienten Mäusen konnte eine verfrühte Chondrozytendifferenzierung hin zu hypertrophen Zellen beobachtet werden, was zu einer übermäßigen Knochenbildung führte [3, 71]. Es kann also aufgrund der vorliegenden Daten in Erwägung gezogen werden, dass die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten sowie das verstärkte Knochenwachstum bei Arthritis durch eine Unterdrückung des inhibitorischen Kontrollsystems durch PTHrP und seines Rezeptors gefördert werden. Demnach wäre der Rückgang der PTH/PTHrP-Rezeptoren ein ursächliches Phänomen der Arthritis.

Die vorliegenden Ergebnisse veranschaulichen eine deutliche Verminderung der PTH1R-Expression auf Chondrozyten bei Arthritis. Andere Studien zeigen einen entsprechenden Effekt auf Osteoblasten bei Arthritis [50, 106].

Im Jahr 2001 untersuchten Hilal et al. Osteoblasten bei Patienten mit Osteoarthritis und fanden heraus, dass die Expression von PTH1R bei OA-Osteoblasten gegenüber normalen Osteoblasten deutlich vermindert ist. Des Weiteren wiesen sie auch erniedrigte Spiegel von PTH1R-mRNA bei Arthritis nach. Insofern entsprechen diese Ergebnisse denen von Sanchez und seinen Mitarbeitern. Auch Hilal et al. stellten die Hypothese auf, dass subchondrale Knochensklerose bedeutsam für das Entstehen oder den Verlauf von Knorpelschäden oder Knorpelverlust bei Arthritis sein kann. Die ermittelten erniedrigten PTH1R-mRNA Spiegel zeigten sich sehr variabel und lagen zwischen - 10 % bis - 60 % verglichen mit normalen Osteoblasten [50].

Die hier vorliegende Studie untersucht ferner erstmalig die Expression des PTH1R auf Synovialozyten im zeitlichen Verlauf einer Arthritis. Wie bereits

angeführt, konnten vorangegangene Studien bereits eine erhöhte Expression eines Liganden des PTH1R, des PTHrP, im Synovialgewebe sowohl von rheumatoider als auch von Osteoarthritis aufzeigen. Funk et al. konnten in ihrer Studie an humanen Synovialisproben von RA-Patienten zeigen, dass die Membrana synovialis sowohl PTHrP als auch PTH1R exprimiert [37].

Leider ließ sich wegen oben angeführter Gründe keine quantitative Auszählung anstellen, so dass es hinsichtlich der Synovialis bei einer Trendaussage bleiben muss. In allen Proben, die eine Membrana synovialis aufwiesen, konnte PTH1R, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, nachgewiesen werden. Somit lässt sich ableiten, dass PTH1R sowohl an physiologischen Vorgängen als auch an pathophysiologischen Entwicklungen der Arthritis beteiligt ist. Die Problematik der Arthritis besteht zum einen aus der Degradation und dem Verlust des hyalinen Gelenkknorpels, zum anderen aus einer entzündlichen Reaktion der Synovialmembran. Diese Synovialitis ist eine sekundäre Entzündung als Reaktion auf die degenerativen Prozesse im Knorpel. Sie bestimmt aber im weiteren Verlauf durch ihren Ausprägungsgrad die Entwicklung der Arthritis wesentlich mit [31]. Histologisch zeichnet sich die Synovialitis hauptsächlich durch eine geringgradige Verbreiterung der synovialen Deckschicht und eine Zunahme des Bindegewebes aus. Ferner kommt es zu einer leichten lymphozytären und plasmazellulären Infiltration [1]. Diese Feststellungen konnten auch im Rahmen dieser Studie angestellt werden. In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung präsentierte sich die Synovialmembran mit einer mehrzelligen Deckschicht und einem erhöhten Anteil an Bindegewebe. Außerdem wiesen diese Proben im Vergleich zu den Präparaten der Gruppe nach Scheinoperation kaum noch Fettzellen auf. Es lässt sich also schlussfolgern, dass die Synovialmembran der Versuchsgruppe eine deutlich heftigere Entzündungsreaktion zeigt, als das Gewebe der Vergleichsgruppe. Unterschiede bezüglich des Ausmaßes der Expression von PTH1R konnten nicht festgestellt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass PTH1R sowohl im entzündlichen, synovialen Gewebe als auch in der gesunden Synovialmembran exprimiert wird.



Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie einen deutlichen Zusammenhang der Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors mit degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels. Aufgrund der hier erarbeiteten Ergebnisse lässt sich die Vermutung erhärten, dass PTH1R eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arthrose spielt. Weitere Studien diesbezüglich sind nötig, um genauere Erkenntnisse über die Funktion des PTH1R, sowohl im gesunden als auch im degenerativ veränderten Knorpel, zu erhalten. Rezeptoren eignen sich gut als Angriffspunkt für eine mögliche medikamentöse Therapie. Auch deswegen sollten nachfolgende Studien angestrengt werden, die weitere Einblicke in die Wechselbeziehung von PTH1R und Arthrose ermöglichen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Altman, R.D., *The classification of osteoarthritis*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: p. 42-3.
2. Amin, A.R. and S.B. Abramson, *The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 1998. **10**(3): p. 263-8.
3. Amizuka, N., et al., *Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1611-23.
4. Asari, A., et al., *Cytochemical localization of hyaluronic acid in human synovium with special reference to its possible process of degradation*. Arch Histol Cytol, 1995. **58**(1): p. 65-76.
5. Aydelotte M. B.; Schumacher, B.L.K., K. E., *Heterogeneity of articular chondrocytes*. Articular cartilage and Osteoarthritis. New York: Raven Press, 1992: p. Seite 237-249.
6. Aydelotte, M.B., R.R. Greenhill, and K.E. Kuettner, *Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism*. Connect Tissue Res, 1988. **18**(3): p. 223-34.
7. Bendele, A.M., *Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**(6): p. 501-3.
8. Benninghoff, *Anatomie*. Vol. 16. 2003, Jena: Urban & Fischer. S. 128 - 133, 254 - 264, 365 - 382.
9. Bertram, C. and W. Lierse, *Morphometric evaluation of chondrocyte cavities in normal and prearthrotic human femoral heads*. Acta Anat (Basel), 1991. **140**(2): p. 183-92.
10. Brent, G.A., et al., *Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(5): p. 944-50.
11. Brighton, C.T., T. Kitajima, and R.M. Hunt, *Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(11): p. 1290-9.
12. Bringhurst, F.R., et al., *Peripheral metabolism of [35S]parathyroid hormone in vivo: influence of alterations in calcium availability and parathyroid status*. J Endocrinol, 1989. **122**(1): p. 237-45.

13. Bucher, O. and H. Wartenberg, *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Vol. 12. 1997: Verlag Hans Huber. S. 126 - 128.
14. Buckwalter J. A.; Glimcher, M.J.C., R. R.; Recker, R., *Bone biology, part II. Formation, modelling, remodelling and regulation of cell function*. . J Bone Joint Surg Am 77., 1995: p. Seite 1276 (B).
15. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage repair and transplantation*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(8): p. 1331-42.
16. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage. Part 1: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. J Bone Joint Surg 79A., 1997: p. Seite 600-611.
17. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 487-504.
18. C Erggelet and M. Steinwachs, *Gelenkknorpeldefekte*. 2001, Darmstadt.: Steinkopfverlag. S. 167-181.
19. Chambers, T.J., N.A. Athanasou, and K. Fuller, *Effect of parathyroid hormone and calcitonin on the cytoplasmic spreading of isolated osteoclasts*. J Endocrinol, 1984. **102**(3): p. 281-6.
20. Chang, D.G., et al., *Quantitation and localization of cartilage degeneration following the induction of osteoarthritis in the rabbit knee*. Osteoarthritis Cartilage, 1997. **5**(5): p. 357-72.
21. Chevalley, T. and R. Rizzoli, *[Bone and hormones. Effects of parathyroid hormone on the bone]*. Presse Med, 1999. **28**(10): p. 547-53.
22. Chung, U.I., *Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development*. Endocr J, 2004. **51**(1): p. 19-24.
23. Chung, U.I., et al., *The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13030-5.
24. Cicuttini, F.M. and T.D. Spector, *Osteoarthritis in the aged. Epidemiological issues and optimal management*. Drugs Aging, 1995. **6**(5): p. 409-20.
25. Clark, J.M., *Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man*. J Orthop Res, 1991. **9**(2): p. 246-57.

26. Convery, F.R., W.H. Akeson, and G.H. Keown, *The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses*. Clin Orthop Relat Res, 1972. **82**: p. 253-62.
27. Cosman, F., et al., *Parathyroid responsivity in postmenopausal women with osteoporosis during treatment with parathyroid hormone*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 788-90.
28. Dean, D.D. and J.F. Woessner, Jr., *Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases*. Biochem J, 1984. **218**(1): p. 277-80.
29. Erdmann, S., et al., *Mapping of a carboxyl-terminal active site of parathyroid hormone by calcium-imaging*. Cell Calcium, 1998. **23**(6): p. 413-21.
30. Everhart-Caye, M., et al., *Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 199-208.
31. Fassbender, H.G., *Role of chondrocytes in the development of osteoarthritis*. Am J Med, 1987. **83**(5A): p. 17-24.
32. Federman, S., L.M. Miller, and I. Sagi, *Following matrix metalloproteinases activity near the cell boundary by infrared micro-spectroscopy*. Matrix Biol, 2002. **21**(7): p. 567-77.
33. Fergusson, C.M., *The aetiology of osteoarthritis*. Postgrad Med J, 1987. **63**(740): p. 439-45.
34. Fong, K.Y., et al., *Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions*. Clin Exp Rheumatol, 1994. **12**(1): p. 55-8.
35. Fritsch, K.G. and O. Josimovic-Alasvic, *Chondroneogenese durch autologe Chondrozytentransplantation (ACT)*. Arthroskopie 12., 1999: p. Seite 43-49.
36. Fukui, N., et al., *Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 3**: p. 59-66.
37. Funk, J.L., et al., *Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. A possible role for locally produced parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1362-71.
38. Furukawa, T., et al., *Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee*. J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(1): p. 79-89.

39. Gomez-Barrena, E., et al., *Sequential changes of parathyroid hormone related protein (PTHrP) in articular cartilage during progression of inflammatory and degenerative arthritis*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(8): p. 917-22.
40. Grauschopf, U., et al., *The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern*. Biochemistry, 2000. **39**(30): p. 8878-87.
41. Greenberg, Z., et al., *Mapping the bimolecular interface of the parathyroid hormone (PTH)-PTH1 receptor complex: spatial proximity between Lys(27) (of the hormone principal binding domain) and leu(261) (of the first extracellular loop) of the human PTH1 receptor*. Biochemistry, 2000. **39**(28): p. 8142-52.
42. Habener, J.F., et al., *Pre-parathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(6): p. 2616-20.
43. Hashimoto, S., et al., *Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3094-9.
44. Hasty, K.A., et al., *The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(3): p. 388-97.
45. Häuselmann, H.J. and E. Hedbom, *Von der Pathogenese der Arthrose zu therapeutischen Empfehlungen und Knorpelersatz*. Schweiz Med Forum, 2002. **Nr. 25**: p. Seite 610-615.
46. Havdrup, T. and H. Telhag, *Papain-induced changes in the knee joints of adult rabbits*. Acta Orthop Scand, 1977. **48**(2): p. 143-9.
47. Hayami, T., et al., *Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis*. Bone, 2006. **38**(2): p. 234-43.
48. Hedlund, H., et al., *Stereologic studies on collagen in bovine articular cartilage*. Apmis, 1993. **101**(2): p. 133-40.
49. Henderson, J.E., et al., *Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4064-75.
50. Hilal, G., et al., *Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(4): p. 713-21.
51. Hoare, S.R., T.J. Gardella, and T.B. Usdin, *Evaluating the signal transduction mechanism of the parathyroid hormone 1 receptor. Effect of receptor-G-protein*

- interaction on the ligand binding mechanism and receptor conformation.* J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7741-53.
52. Hock, J.M. and I. Gera, *Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone.* J Bone Miner Res, 1992. **7**(1): p. 65-72.
  53. Hofbauer, L.C., et al., *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.* J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 2-12.
  54. Horiuchi, T., et al., *The increase of parathyroid hormone-related peptide and cytokine levels in synovial fluid of elderly rheumatoid arthritis and osteoarthritis.* Endocr J, 1999. **46**(5): p. 643-9.
  55. Hüfner, M. and H. Siggelkow, *Neuere Erkenntnisse zur Pathogenese der Steroidosteoporose.* Dtsch Med Wochenschr 2003; 128: 1602-1608, 2003.
  56. Hulth, A., L. Lindberg, and H. Telhag, *Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report.* Acta Orthop Scand, 1970. **41**(5): p. 522-30.
  57. Imhoff, A.B., et al., *Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken.* Ortopäde 28, 1999: p. Seite 33-44.
  58. Joosten, L.A., et al., *Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra.* Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 797-809.
  59. Juppner, H., *Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development.* Pediatr Nephrol, 2000. **14**(7): p. 606-11.
  60. Juppner, H. and E. Schipani, *Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide: from molecular cloning to definition of diseases.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 1996. **5**(4): p. 300-6.
  61. Karaplis, A.C. and R.A. Deckelbaum, *Role of PTHrP and PTH-1 receptor in endochondral bone development.* Front Biosci, 1998. **3**: p. d795-803.
  62. Karaplis, A.C., et al., *Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand chondrodysplasia.* Endocrinology, 1998. **139**(12): p. 5255-8.
  63. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis.* Ann Rheum Dis, 1957. **16**(4): p. 494-502.
  64. Klinke, R. and S. Silbernagel, *Lehrbuch der Physiologie.* Vol. 4. korrigierte Aufl. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

65. Knudson, C.B., *Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix*. J Cell Biol, 1993. **120**(3): p. 825-34.
66. Kohno, H., et al., *Synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis contain high levels of parathyroid hormone-related peptide*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(5): p. 847-54.
67. Kovacs, C.S., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15233-8.
68. Kronenberg, H.M., *PTHrP and skeletal development*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 1-13.
69. Kronenberg, H.M., A.C. Karaplis, and B. Lanske, *Role of parathyroid hormone-related protein in skeletal development*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **785**: p. 119-23.
70. Langenskiöld, A., J.E. Michelsson, and T. Videman, *Osteoarthritis of the knee in the rabbit produced by immobilization. Attempts to achieve a reproducible model for studies on pathogenesis and therapy*. Acta Orthop Scand, 1979. **50**(1): p. 1-14.
71. Lanske, B., et al., *PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth*. Science, 1996. **273**(5275): p. 663-6.
72. Leonhardt, H., *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 1990: Thieme Verlag. S. 134 - 137.
73. Liu, B.Y., et al., *Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(4): p. 1952-64.
74. Luck, M.D., P.H. Carter, and T.J. Gardella, *The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(5): p. 670-80.
75. Mankin, H.J., *The response of articular cartilage to mechanical injury*. J Bone Joint Surg Am, 1982. **64**(3): p. 460-6.
76. Mankin, H.J., et al., *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. J Bone Joint Surg Am, 1971. **53**(3): p. 523-37.
77. Mankin, H.J. and A.Z. Thrasher, *Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1975. **57**(1): p. 76-80.

78. Mannstadt, M., H. Juppner, and T.J. Gardella, *Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. F665-75.
79. Martel-Pelletier, J., *Proinflammatory mediators and osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(3): p. 315-6.
80. Massicotte, F., et al., *Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(6): p. 491-500.
81. Meachim, G. and D.H. Collins, *Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulphate (35SO4) in vitro*. Ann Rheum Dis, 1962. **21**: p. 45-50.
82. Menkes, C.J., *Radiographic criteria for classification of osteoarthritis*. J Rheumatol Suppl, 1991. **27**: p. 13-5.
83. Mitlak, B.H., et al., *Sequential effects of chronic human PTH (1-84) treatment of estrogen-deficiency osteopenia in the rat*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(4): p. 430-9.
84. Moskowitz, R.W., *Experimental models of degenerative joint disease*. Semin Arthritis Rheum, 1972. **2**(1): p. 95-116.
85. Muir, H., P. Bullough, and A. Maroudas, *The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications*. J Bone Joint Surg Br, 1970. **52**(3): p. 554-63.
86. Muller, B. and D. Kohn, *[Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]*. Orthopade, 1999. **28**(1): p. 4-10.
87. Murphy, G., et al., *Matrix metalloproteinases in arthritic disease*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S39-49.
88. Nakase, T., et al., *Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(4): p. 278-84.
89. Niethardt, F.U. and J. Pfeil, *Orthopädie*. Vol. 5. Auflage. 2005, Stuttgart: Thieme Verlag. 184-190.
90. Okada, Y., et al., *Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption*. Endocr J, 2002. **49**(4): p. 483-95.



91. Okano, K., et al., *Expression of parathyroid hormone-related peptide in human osteoarthritis*. J Orthop Res, 1997. **15**(2): p. 175-80.
92. Osborn, K.D., S.B. Trippel, and H.J. Mankin, *Growth factor stimulation of adult articular cartilage*. J Orthop Res, 1989. **7**(1): p. 35-42.
93. Parkkinen, J.J., et al., *Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro*. J Orthop Res, 1992. **10**(5): p. 610-20.
94. Piskin, A., et al., *Osteoarthritis models after anterior cruciate ligament resection and medial meniscectomy in rats. A histological and immunohistochemical study*. Saudi Med J, 2007. **28**(12): p. 1796-802.
95. Plotkin, H., et al., *Dissociation of bone formation from resorption during 2-week treatment with human parathyroid hormone-related peptide-(1-36) in humans: potential as an anabolic therapy for osteoporosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(8): p. 2786-91.
96. Poole, C.A., *Articular cartilage chondrons: form, function and failure*. J Anat, 1997. **191** ( Pt 1): p. 1-13.
97. Potts, J.T., Jr., et al., *Synthesis of a biologically active N-terminal tetratriacontapeptide of parathyroid hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(1): p. 63-7.
98. Pullig, O., D. Pfander, and B. Swoboda, *Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression*. Der Orthopäde 30., 2001: p. Seite 825-833.
99. Rahamimov, R. and J. Silver, *The molecular basis of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure*. Isr J Med Sci, 1994. **30**(1): p. 26-31.
100. Reeve, J., *PTH: a future role in the management of osteoporosis?* J Bone Miner Res, 1996. **11**(4): p. 440-5.
101. Roos, H., et al., *Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age*. Osteoarthritis Cartilage, 1995. **3**(4): p. 261-7.
102. Roth, V. and V.C. Mow, *The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age*. J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(7): p. 1102-17.
103. Rother, P., et al., *[Quantitative analysis of cell density and pattern of chondrocytes in transitory hyaline cartilage anlagen of human tarsal bones.]*. Acta Anat (Basel), 1990. **138**(4): p. 327-31.

104. Sah, R.L., et al., *Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression*. J Orthop Res, 1989. **7**(5): p. 619-36.
105. Sanchez, C., et al., *Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate Aggrekan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(11): p. 979-87.
106. Sanchez, C., et al., *Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(11): p. 988-97.
107. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Res, 2001. **3**(2): p. 107-13.
108. Saxena, R.K., K.B. Sahay, and S.K. Guha, *Morphological changes in the bovine articular cartilage subjected to moderate and high loadings*. Acta Anat (Basel), 1991. **142**(2): p. 152-7.
109. Schiebler T. H., e.a., *Anatomie*. Vol. 8. Auflage. 2002, Berlin, Heidelberg: Springer - Verlag. 137 - 142; 331 - 338.
110. Schipani, E., et al., *Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor*. Endocrinology, 1993. **132**(5): p. 2157-65.
111. Schipani, E., K. Kruse, and H. Juppner, *A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia*. Science, 1995. **268**(5207): p. 98-100.
112. Schipani, E., et al., *Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia*. N Engl J Med, 1996. **335**(10): p. 708-14.
113. Schmidt, U., *Pressemitteilung BMGS 2/2004*, B.f.G.u.s. Gerechtigkeit, Editor. 2004.
114. Shapiro, F., S. Koide, and M.J. Glimcher, *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1993. **75**(4): p. 532-53.
115. Sobotta, J. and U. Welsch, *Lehrbuch Histologie*. Vol. 1. 2003, Jena: Urban & Fischer.

116. St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, and A.P. McMahon, *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2072-86.
117. Stanislaus, D., V. Devanarayan, and J.M. Hock, *In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH)(1-34) and hPTH(1-84) in the distal femur metaphyses of young mice*. Bone, 2000. **27**(6): p. 819-26.
118. Steinhagen, J., et al., *The pathophysiology of cartilage diseases*. Ortop Traumatol Rehabil, 2001. **3**(2): p. 163-8.
119. Stockwell, R.A., *The cell density of human articular and costal cartilage*. J Anat, 1967. **101**(Pt 4): p. 753-63.
120. Stockwell, R.A., *The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage*. J Anat, 1971. **109**(Pt 3): p. 411-21.
121. Studer, R.K., et al., *Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(4): p. C961-9.
122. Suva, L.J., et al., *A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression*. Science, 1987. **237**(4817): p. 893-6.
123. Takahashi, K., et al., *The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(2): p. 182-90.
124. Terkeltaub, R., et al., *Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(12): p. 2152-64.
125. Thompson, R.C., Jr., *An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint*. Clin Orthop Relat Res, 1975(107): p. 239-48.
126. Torelli, S.R., et al., *Histopathological evaluation of treatment with chondroitin sulphate for osteoarthritis induced by continuous immobilization in rabbits*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2005. **52**(1): p. 45-51.
127. Troyer, H., *Experimental models of osteoarthritis: a review*. Semin Arthritis Rheum, 1982. **11**(3): p. 362-74.

128. Tsukazaki, T., et al., *Expression of parathyroid hormone-related protein in rat articular cartilage*. Calcif Tissue Int, 1995. **57**(3): p. 196-200.
129. Tucci, J., et al., *The role of fetal parathyroid hormone-related protein in transplacental calcium transport*. J Mol Endocrinol, 1996. **17**(2): p. 159-64.
130. Urena, P., *[The PTH/PTHrP receptor: biological implications]*. Nefrologia, 2003. **23 Suppl 2**: p. 12-7.
131. van de Loo, F.A., et al., *Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in interleukin-6-deficient mice*. Am J Pathol, 1997. **151**(1): p. 177-91.
132. van den Berg, W.B., *The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Z Rheumatol, 1999. **58**(3): p. 136-41.
133. Vasan, N., *Proteoglycans in normal and severely osteoarthritic human cartilage*. Biochem J, 1980. **187**(3): p. 781-7.
134. Vignon, E., et al., *Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis*. J Rheumatol, 1987. **14 Spec No**: p. 104-6.
135. Vortkamp, A., *Molekulare Kontrolle der Skelettdifferenzierung Tätigkeitsbericht 2003 Max Planck Institut für molekulare Genetik*, 2003.
136. Vortkamp, A., et al., *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. Science, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
137. Wachtler, F., *Histologie. Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. 2000: Facultas Univ. Verl. S. 140 - 143.
138. Walakovits, L.A., et al., *Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(1): p. 35-42.
139. Weir, E.C., et al., *Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10240-5.
140. Weiss, C., *Normal and osteoarthritic articular cartilage*. Orthop Clin North Am, 1979. **10**(1): p. 175-89.
141. Westacott, C.I. and M. Sharif, *Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?* Semin Arthritis Rheum, 1996. **25**(4): p. 254-72.
142. Westacott, C.I., et al., *Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(7): p. 1282-91.

143. Wong, M., et al., *Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography*. J Orthop Res, 1996. **14**(3): p. 424-32.
144. Yamamoto, M., et al., *Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5326-30.
145. Yasui, T., et al., *Ultrastructural localization of hyaluronic acid in the synovium of the goat knee joint*. Ann Anat, 2004. **186**(4): p. 379-84.
146. Yoshida, T., et al., *Production of parathyroid hormone-related peptide by synovial fibroblasts in human osteoarthritis*. FEBS Lett, 1998. **433**(3): p. 331-4.
147. Yoshioka, M., et al., *Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee*. Osteoarthritis Cartilage, 1996. **4**(2): p. 87-98.
148. Zhang, P., et al., *A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3365-8.

## 6 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Zonen des Gelenkknorpels (übernommen aus "Der Orthopäde" 08/97)	16
<b>Abbildung 2</b>	PTH/PTHrP-Rezeptor	36
<b>Abbildung 3</b>	Intraoperativer Lachmann-Test: Knie in Normalstellung	42
<b>Abbildung 4</b>	Intraoperativer Lachmann-Test: deutlich nachweisbare vordere Schublade	42
<b>Abbildung 5</b>	Wundverhältnisse postoperativ. Beide Knie	43
<b>Abbildung 6</b>	Wundversorgung des Kniegelenks postoperativ	43
<b>Abbildung 7</b>	Anzahl der Gelenke mit Ulzerationen des Knorpels in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	53
<b>Abbildung 8</b>	Anzahl der Gelenke mit Osteophyten in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	54
<b>Abbildung 9</b>	Anzahl der Gelenke mit Erguss in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	55
<b>Abbildung 10</b>	Intakter Knorpel beider Femurkondylen eines nicht operierten Tieres der Kontrollgruppe	55
<b>Abbildung 11</b>	Deutliche Fibrillationen und Osteophytenbildung beider Femurkondylen (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	56
<b>Abbildung 12</b>	Beginnende Knorpeldefekte bis auf den subchondralen Knochen mit ausgeprägter Osteophytenbildung (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	56
<b>Abbildung 13</b>	Deutlicher Knorpeldefekt mit Freilegung des subchondralen Knochens und ausgeprägter Osteophytenbildung (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	57

<b>Abbildung 14</b>	Vergleich des makroskopischen Arthrosegrades der Versuchsgruppe und der Vergleichsgruppe	58
<b>Abbildung 15</b>	Anzahl der Gelenke mit Proteoglykanverlust in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	59
<b>Abbildung 16</b>	Kräftige Anfärbung der Proteoglykane; kein Proteoglykanverlust (6 Wochen nach Scheinoperation)	60
<b>Abbildung 17</b>	Geringe Reduktion der Färbungsintensität aufgrund beginnenden Proteoglykanverlustes (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	60
<b>Abbildung 18</b>	Mäßige Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fortgeschrittenen Proteoglykanverlustes (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	61
<b>Abbildung 19</b>	Starke Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fast vollständigen Proteoglykanverlustes (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	61
<b>Abbildung 20</b>	Vergleich des histologischen Arthrosegrades nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation	63
<b>Abbildung 21</b>	Korrelation zwischen makroskopischem und histologischem Arthrosegrad	63
<b>Abbildung 22</b>	Histologisches Bild eines intakten Knorpels eines nicht operierten Tieres	64
<b>Abbildung 23</b>	Beginnende Zerstörung der Knorpelstruktur (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	64
<b>Abbildung 24</b>	Vollständige Aufhebung der Knorpelarchitektur mit Rissbildung und Knorpelzell-Clustern (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	65
<b>Abbildung 25</b>	Tiefe Rissbildung und Zerstörung der Knorpeloberfläche (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	65
<b>Abbildung 26</b>	Vollständiger Verlust des Knorpels bis auf einen schmalen, noch verbliebenen Randsaum	66

<b>Abbildung 27</b>	Immunhistochemische Anfärbung von PTH1R	67
<b>Abbildung 28</b>	Kontrolle der immunhistochemischen Anfärbung von PTH1R	67
<b>Abbildung 29</b>	Vergleich der PTH1R-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation im zeitlichen Verlauf	69
<b>Abbildung 30</b>	PTH1R-stark-positive Chondrozyten nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation im zeitlichen Verlauf	69
<b>Abbildung 31</b>	PTH1R-einfach-positive Chondrozyten nach Kreuzbanddurchtrennung und Scheinoperation im zeitlichen Verlauf	70
<b>Abbildung 32</b>	Korrelation histologischer Arthrosegrad nach Mankin und PTH1R-Expression	70
<b>Abbildung 33</b>	Korrelation makroskopischer Arthrosegrad und PTH1R-Expression	71
<b>Abbildung 34</b>	PTH1R-Expression 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung	72
<b>Abbildung 35</b>	PTH1R-Expression 3 Wochen nach Scheinoperation	72
<b>Abbildung 36</b>	PTH1R-Expression 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung	73
<b>Abbildung 37</b>	PTH1R-Expression 6 Wochen nach Scheinoperation	73
<b>Abbildung 38</b>	PTH1R-Expression 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung	74
<b>Abbildung 39</b>	PTH1R-Expression 12 Wochen nach Scheinoperation	74
<b>Abbildung 40</b>	Immunhistochemische Anfärbung von PTH1R	75
<b>Abbildung 41</b>	Kontrolle der immunhistochemischen Anfärbung von PTH1R	76



## 7 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt

- **Frau Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann** für die Überlassung dieses Themas
- **Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Carsten O. Tibesku** für die fortwährende Betreuung, Unterstützung und gute Zusammenarbeit
- **Herrn Dr. rer. nat. Thomas Szuwart** für die Unterstützung und kompetente Beratung bezüglich Färbeverfahren und Beurteilung histologischer Bilder
- Der **MTA Frau Sabine Kupich** für ihre enorme Hilfsbereitschaft, ihre Ratschläge und ihre helfende Hand beim Anfertigen der histologischen Schnitte
- **Meiner Familie** für Ihre unentwegte Unterstützung während der langen Zeit meiner Ausbildung
- **Meiner Freundin** für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihre aufmunternden Worte bei einer Vielzahl von Rückschlägen

## 8 Anhang

### 8.1 Makroskopische Befunde

Gelenk	Wochen postoperativ	Fibrillationen	Ulzerationen	Osteophyten	Erguss	Kreuzband
01 re	12	keine	keine	keine	kein	erhalten
01 li	12	keine	keine	keine	kein	erhalten
2 re	12	gering	keine	keine	kein	erhalten
2 li	12	keine	keine	keine	kein	erhalten
3 re	12	keine	keine	gering	kein	erhalten
3 li	12	keine	keine	gering	kein	erhalten
4 re	6	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
4 li	6	mittelgradig	keine	mittelgradig	gering	durchtrennt
6 re	6	mittelgradig	keine	keine	kein	erhalten
6 li	6	gering	keine	keine	kein	erhalten
7 re	12	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	ausgeprägt	durchtrennt
7 li	12	mittelgradig	kleinflächig	ausgeprägt	ausgeprägt	durchtrennt
9 re	6	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
9 li	6	mittelgradig	kleinflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
10 re	12	gering	keine	keine	kein	erhalten
10 li	12	gering	keine	keine	kein	erhalten
11 re	12	ausgeprägt	keine	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
11 li	12	ausgeprägt	kleinflächig	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
12 re	12	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
12 li	12	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
13 re	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
13 li	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
14 re	3	keine	keine	gering	kein	erhalten
14 li	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
15 re	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
15 li	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
16 re	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
16 li	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
17 re	6	gering	keine	mittelgradig	kein	durchtrennt
17 li	6	gering	kleinflächig	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
18 re	6	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
18 li	6	ausgeprägt	kleinflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
19 re	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
19 li	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
20 re	3	mittelgradig	kleinflächig	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
20 li	3	mittelgradig	großflächig	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
21 re	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
21 li	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
22 re	3	gering	keine	gering	mittelgradig	durchtrennt
22 li	3	gering	keine	gering	mittelgradig	durchtrennt
23 re	3	gering	keine	keine	kein	erhalten
23 li	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
24 re	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
24 li	3	gering	keine	gering	kein	erhalten
25 re	6	gering	keine	keine	kein	erhalten
25 li	6	gering	keine	keine	kein	erhalten

## 8.2 Histologische Befunde

Gelenk	Struktur	Zellen	Färbungsintensität Safranin - O	Integrität Übergangszone	Mankin- Score
1 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
1 li	Normal	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	intakt	2
2 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
2 li	Normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
3 re	Normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
3 li	Normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
4 re	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
4 li	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	starke Reduktion	intakt	10
6 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
6 li	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
7 re	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
7 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	5
9 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
9 li	Risse bis in die Radiärzone	diffuse Hyperzellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
10 re	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
10 li	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
11 re	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	11
11 li	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	11

<b>Gelenk</b>	<b>Struktur</b>	<b>Zellen</b>	<b>Färbungsintensität Safranin - O</b>	<b>Integrität Übergangszone</b>	<b>Mankin- Score</b>
12 re	Pannus und Oberfl.- unregelmäßigkeiten	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	8
12 li	komplette Desorganisation	Hypozellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	14
13 re	normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
13 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	normal	von Blutgefäßen durchzogen	2
14 re	normal	normal	starke Reduktion	intakt	3
14 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
15 re	normal	normal	normal	intakt	0
15 li	normal	normal	normal	intakt	0
16 re	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
16 li	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	9
17 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
17 li	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	8
18 re	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
18 li	Risse bis in die Radiärzone	diffuse Hyperzellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	9
19 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	Hypozellularität	starke Reduktion	intakt	7
19 li	Risse bis in die Radiärzone	normal	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	7
20 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	Hypozellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	9
20 li	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	11
21 re	normal	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
21 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4

## Danksagungen

---

<b>Gelenk</b>	<b>Struktur</b>	<b>Zellen</b>	<b>Färbungsintensität Safranin - O</b>	<b>Integrität Übergangszone</b>	<b>Mankin- Score</b>
22 re	normal	normal	mäßige Reduktion	intakt	2
22 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	intakt	2
23 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
23 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	5
24 re	normal	diffuse Hyperzellularität	mäßige Reduktion	intakt	3
24 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
25 re	normal	normal	normal	intakt	0
25 li	normal	normal	normal	intakt	0
N1 re	normal	normal	normal	von Blutgefäßen durchzogen	1
N1 li	normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
N2 re	normal	normal	normal	intakt	0
N2 li	normal	normal	normal	intakt	0
N3 re	normal	normal	mäßige Reduktion	intakt	2
N3 li	normal	normal	mäßige Reduktion	intakt	2
N4 re	normal	normal	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
N4 li	normal	diffuse Hyperzellularität	starke Reduktion	intakt	4

### 8.3 PTH1R-Expression

#### 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

<b>Gewebe- probe</b>		<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
16 li	a	27	91	29,67	9,48
	b	17	96	17,71	
	c	0	49	0	
	d	0	0	0	
16 re	a	0	58	0	0,67
	b	1	75	1,34	
19 li	a	4	61	6,56	7
	b	11	62	17,74	
	c	1	27	3,7	
	d	0	6	0	
19 re	a	5	97	5,15	8,3
	b	8	83	9,64	
	c	10	99	10,1	
20 li	a	15	160	9,38	3,13
	b	0	49	0	
	c	0	48	0	
20 re	a	16	90	17,78	16,09
	b	25	95	26,32	
	c	4	96	4,17	
22 li	a	1	67	1,49	1,79
	b	1	48	2,08	
22 re	a	9	107	8,41	5,3
	b	10	95	10,53	
	c	0	87	0	
	d	2	89	2,25	

3 Wochen nach Scheinoperation

<b>Gewebe- probe</b>	<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
14 li a	53	78	67,95	50,93
b	55	106	51,89	
c	29	88	32,95	
14 re a	13	123	10,57	21,75
b	21	121	17,36	
c	25	67	37,31	
21 li a	2	77	2,6	2,56
b	3	129	2,33	
c	3	109	2,75	
21 re a	11	89	12,36	7,9
b	8	97	8,25	
c	4	129	3,1	
23 li a	23	71	32,39	13,58
b	12	74	16,22	
c	2	64	3,13	
d	2	77	2,6	
23 re a	33	74	44,59	46,42
b	48	77	62,34	
c	43	133	32,33	
24 li a	1	92	1,09	5,72
b	3	84	3,57	
c	12	96	12,5	
24 re a	13	71	18,31	20
b	12	43	27,91	
c	8	58	13,79	

6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

<b>Gewebe- probe</b>	<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
04 li a	0	87	0	5,56
b	0	1	0	
c	3	26	11,54	
d	6	56	10,71	
04 re a	10	55	18,18	5,62
b	8	96	8,33	
c	0	1	0	
d	0	40	0	
e	1	63	1,59	
09 li a	18	89	20,22	15,76
b	10	90	11,11	
c	11	69	15,94	
09 re a	32	104	30,77	17,89
b	7	85	8,24	
c	17	86	19,77	
d	12	94	12,77	
17 li a	12	64	18,75	12
b	7	45	15,56	
c	1	59	1,69	
17 re a	23	89	25,84	36,58
b	29	93	31,18	
c	18	45	40	
d	35	71	49,3	
18 li a	1	73	1,37	3,58
b	7	77	9,1	
c	1	26	3,85	
d	0	86	0	
18 re a	19	64	29,69	24,14
b	23	40	57,5	
c	0	55	0	
d	6	64	9,38	



6 Wochen nach Scheinoperation

<b>Gewebe- probe</b>	<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
06 li a	26	59	44,07	23,67
b	7	56	12,5	
c	2	56	3,57	
d	19	55	34,55	
06 re a	23	68	33,82	31,92
b	23	59	38,98	
c	14	61	22,95	
13 li a	46	127	36,22	32,88
b	34	108	31,48	
c	30	97	30,93	
13 re a	7	89	7,87	15,96
b	19	79	24,05	
15 li a	49	131	37,4	55,94
b	24	41	58,54	
c	46	64	71,88	
15 re a	21	81	25,93	33,45
b	39	111	35,14	
c	33	84	39,29	
25 li a	36	100	36	30,76
b	54	129	41,86	
c	16	111	14,41	
25 re a	27	77	35,06	46,58
b	39	89	43,82	
c	30	67	44,78	
d	47	75	62,67	

12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

<b>Gewebe- probe</b>	<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
07 li a	1	89	1,12	14,09
b	2	48	4,17	
c	19	81	23,46	
d	22	55	40	
e	1	58	1,72	
07 re a	3	54	5,56	5,79
b	4	62	6,45	
c	3	56	5,36	
11 li a	14	163	8,59	3,03
b	8	144	5,56	
c	1	100	1	
d	0	94	0	
e	0	81	0	
11 re a	2	166	1,2	4,75
b	7	70	10	
c	5	64	7,81	
d	0	93	0	
12 li a	2	54	3,7	8,83
b	2	14	14,29	
c	4	60	6,67	
d	5	47	10,64	
12 re a	16	76	21,05	18,38
b	29	64	45,31	
c	3	42	7,14	
d	0	62	0	

12 Wochen nach Scheinoperation

<b>Gewebe- probe</b>	<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
01 li a	31	73	42,47	36,09
b	46	90	51,11	
c	20	110	18,18	
d	30	92	32,61	
01 re a	39	87	44,83	37,79
b	21	88	23,86	
c	41	104	39,42	
d	34	79	43,04	
02 li a	18	51	35,29	24,25
b	12	43	27,91	
c	13	68	19,12	
d	13	65	20	
e	13	59	22,03	
f	15	71	21,13	
02 re a	27	137	19,71	13,36
b	22	122	18,03	
c	2	85	2,35	
03 li a	32	65	49,23	41,67
b	36	76	47,37	
c	37	67	55,22	
d	22	94	23,4	
e	29	97	29,9	
f	35	78	44,87	
03 re a	36	103	34,95	30,02
b	8	39	20,51	
c	9	47	19,15	
d	30	66	45,45	
10 li a	38	108	35,19	28,21
b	27	87	31,03	
c	14	76	18,42	
10 re a	30	90	33,33	32,86
b	28	91	30,77	
c	20	58	34,48	

Kontrolltiere

<b>Gewebe- probe</b>	<b>PTH1R-positive Zellen</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>PTH1R in %</b>	<b>PTH1R / Gelenk in %</b>
N1 li a	25	85	29,41	25,46
b	23	107	21,5	
N1 re a	37	93	39,78	30,26
b	37	107	34,58	
c	14	70	20	
d	20	75	26,67	
N2 li a	53	139	38,13	26,1
b	20	139	14,39	
c	33	128	25,78	
N2 re a	61	107	57,01	43,52
b	58	123	47,15	
c	50	127	39,37	
d	29	95	30,53	
N3 li a	41	52	78,85	54,55
b	23	55	41,82	
c	26	56	46,43	
d	23	45	51,11	
N3 re a	15	91	16,48	10,98
b	6	71	8,45	
c	10	71	14,08	
d	5	102	4,9	
N4 li a	30	97	30,93	31,45
b	20	63	31,75	
c	25	86	29,07	
d	32	94	34,04	
N4 re a	25	74	33,78	24,51
b	20	78	25,64	
c	20	85	23,53	
d	11	73	15,07	

## 8.4 Ergebnisse – Mittelwerte

Versuchs- dauer	Kreuzband- durchtrennung	Schein- operation	Kontrollgruppe	Mann- Whitney-U- Test
	[MW ± STABW]	[MW ± STABW]	[MW ± STABW]	P
0 Wochen			30,79 ± 13,17 n = 8	
3 Wochen	6,47 ± 4,97 n = 8	21,11 ± 18,30 n = 8		0,059
6 Wochen	15,14 ± 11,18 n = 8	33,90 ± 12,47 n = 8		0,016
12 Wochen	9,15 ± 5,96 n = 6	30,53 ± 8,89 n = 8		0,005

MW = Mittelwert

STABW = Standardabweichung

n = Anzahl ausgewerteter Gelenke

## 8.5 Bescheinigungen über die Genehmigung des Tierversuchs

\*ENTWURF\*

Dateiname: N:\T\_VERS\GENNEU

Erstellt am 24.07.00

Bearbeiter: moel



### Bezirksregierung Münster

I.

Bezirksregierung Münster - 48129 Münster

#### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

Prof. Dr. W. Winkelmann  
Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Orthopädie der  
Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33

Ab 25. JULI 2000

Dienstgebäude

Domplatz 1-3

Telefon: (0251) 411-0

Durchwahl: 2110

Zimmer: 431

Frau Möllers

Aktenzeichen

23.0835.1.0 (G 49/2000)

25. Juli 2000

48129 Münster

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 29.05.2000, hier eingegangen  
am 06.06.2000

#### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Winkelmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

**Untersuchung der Konzentration des Hyaluronsäurerezeptors CD44 in der Gelenkflüssigkeit bei experimentell induzierter Arthrose am Beispiel des Kniegelenkes des Kaninchens.**

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreterin sind:

Herr  
Prof. Dr. med. W. Winkelmann  
Klinik und Poliklinik  
für Allgemeine Orthopädie  
der WWU Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33

Frau  
Dr. med. Susanne Fuchs  
Klinik und Poliklinik  
für Allgemeine Orthopädie  
der WWU Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

48129 Münster:

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • X-400: C=de, A=dlp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle • Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2, 10, 11, 14, 21, 64 bis Domplatz

„Diskopie Bezirksregierung Münster“

Diese Genehmigung gilt bis zum **28. 02. 2002.**

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

24 Neuseeland-Kaninchen.

## Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

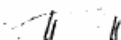
## Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

**Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbeskennnisses.**

Mit freundlichen Grüßen  
I. A.



Dr. Wissing

"Dienstkopie Bezirksregierung Münster"



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
z.H. Herrn Prof. Dr. W. Winkelmann  
Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

DER  
OBERBÜRGERMEISTER

STADT MÜNSTER

VETERINÄR- UND  
LEBENSMITTEL-  
ÜBERWACHUNGSAMT

Scheimenstiege 1  
Auskunft erteilt:  
Frau Heumann  
Zimmer: 106  
Telefon: 02534/971 - 301  
Telefax: 02534/971 - 399  
E-Mail: Amt\_39@stadt-  
muenster.de  
Sprechzeiten:  
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:  
29.05.2000 an die Bezirksregierung  
hier eingegangen am 19.06.2000

Mein Zeichen (Bitte angeben):  
39/401 a)

Münster,  
11.07.2000

## Tierschutzgesetz; Tierversuch G 49/2000

Versuchsleiter und Antragsteller:  
Prof. Dr. W. Winkelmann

Stellvertreterin:  
Dr. Susanne Fuchs

Sehr geehrter Herr Professor Winkelmann,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

24 Neuseeland-Kaninchen.

### Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger des Tierstalles zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Professor Richter von der ZTE zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die Tierversuche, die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen. Diese sind drei Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und mir auf Verlangen zur Einsichtnahme vorzulegen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart- und -zahl sowie der Unterbringung sind mir umgehend mitzuteilen.

Bitte beachten Sie, dass der Versuch erst begonnen werden kann, wenn Ihnen die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vorliegt. Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.

Dr. Bolle  
Städt. Oberveterinärarzt

### Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster  
Landeszentralbank Münster  
Postbank Dortmund  
Bank für Gemeinwirtschaft  
Bankhaus Lampe Münster

Kto.-Nr. 752  
Kto.-Nr. 40 001 700  
Kto.-Nr. 21 1 36-461  
Kto.-Nr. 1 010 505 100  
Kto.-Nr. 305 002

(BLZ 400 501 50)  
(BLZ 400 000 00)  
(BLZ 440 100 46)  
(BLZ 400 101 11)  
(BLZ 490 201 51)

Commerzbank Münster  
Deutsche Bank Münster  
Dresdner Bank Münster  
Volksbank Münster eG  
Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 040  
Kto.-Nr. 0470 005  
Kto.-Nr. 606 465 600  
Kto.-Nr. 4 200 800  
Kto.-Nr. 61 226

(BLZ 400 400 28)  
(BLZ 400 700 80)  
(BLZ 400 800 40)  
(BLZ 401 600 50)  
(BLZ 400 500 00)

### Zentrale Verbindungen

Hauptvermittlung (0251) 492-0  
Telefax (0251) 492-7700  
Datex-J \*0251492#  
E-Mail Stadtverwaltung@stadt-muenster.de



DER  
OBERBÜRGERMEISTER



VETERINÄR- UND  
LEBENSMITTEL-  
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmensiege 1

Auskunft erteilt:  
Frau Heumann  
Zimmer: 106  
Telefon: 02534/971 - 301  
Telefax: 02535/971 - 399  
E-Mail:  
Amt39@stadt-muenster.de  
Sprechzeiten:  
nach Vereinbarung

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Frau  
PD Dr. Susanne Fuchs  
Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Orthopädie  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48149 Münster

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:  
23.07.2001 an die Bezirksregierung  
hier eingegangen am 03.09.2001

Mein Zeichen (Bitte angeben):  
39/401 a)

Münster,  
06.09.2001

## Tierschutzgesetz;

<b>Tierversuch: A 58/2001</b>	
<b>VersuchsleiterIn:</b> Frau Dr. Susanne Fuchs	<b>Stellvertreter und Antragsteller:</b> Dr. Carsten O. Tibesku

Sehr geehrte Frau Dr. Fuchs,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur  
Haltung von

4 Kaninchen.

Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Tierpfleger Ihres Institutes zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Dr. Lücke, Leiter der ZTE, zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die Tierversuche, die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen. Diese sind drei Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und mir auf Verlangen zur Einsichtnahme vorzulegen.
5. Änderung und Erweiterung im Personalbereich, bei der Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

**Die Erlaubnis gilt für die Laufzeit des angezeigten Versuches.**

Mit freundlichen Grüßen

i.A.

Dr. Otto  
Städt. Veterinärdirektor

### Konten der Stadtkasse

Stadtparkasse Münster Kto.-Nr. 752  
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 49 001 700  
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 136-461  
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100  
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50) Commerzbank Münster  
(BLZ 400 000 00) Deutsche Bank Münster  
(BLZ 440 100 46) Dresdner Bank Münster  
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG  
(BLZ 400 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 000  
Kto.-Nr. 0470 005  
Kto.-Nr. 606 465 000  
Kto.-Nr. 4 200 800  
Kto.-Nr. 51 225

(BLZ 400 400 28)  
(BLZ 400 700 80)  
(BLZ 400 600 40)  
(BLZ 401 600 50)  
(BLZ 400 500 00)

### Zentrale Verbindungen

☛ Hauptvermittlung (0251) 492-0  
Telefax (0251) 492-7700  
Daten-J (0251) 492-7700  
E-Mail: Stadtverwaltung@stadt-muenster.de



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Frau

PD Dr. med. Susanne Fuchs  
Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Orthopädie des  
Universitätsklinikums Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
Aktenzeichen  
50.0835.2.0 (A 58/2001)

48149 Münster

18. August 2001

**Anzeige von Versuchsvorhaben gemäß § 8 a Abs. 1 und 2  
Tierschutzgesetz (TierSchG);**

**Versuchsvorhaben: "Tötung von vier weißen Neuseelandkaninchen  
zur Entnahme beider Kniegelenke"**

Ihre Anzeige vom 23.07.2001 - hier eingegangen am 30.07.2001

Sehr geehrte Frau Dr. Fuchs,

Ihre o.a. Anzeige wird hiermit bestätigt.  
Einer Genehmigung für das Versuchsvorhaben bedarf es nicht.

Ich weise jedoch darauf hin, daß Sie gemäß § 8b Abs. 5 TierSchG  
den für Sie zuständigen Tierschutzbeauftragten zu unterrichten  
haben.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Möllers

## **8.6 Meine akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster waren

Assmann, Becker, Bek, Berdel, Bieker, Böcker, Breithardt, Brinkmann, Bullmann, Domschke, Erren, Filler, Friedrich, Fuchs-Winkelmann, Gabriëls, Gosheger, Götze, Harms, Hausberg, Jürgens, Korfmeier, Mersmann, Mesters, Oberleitner, Pavenstädt, Pera, Raschke, Ringelstein, Scheld, Schober, Senninger, Speckmann, Szuwart, Tibesku, Willich, Winkelmann, Witting, Wittkowski, Zühlsdorf

Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich meinen Lehrern an der Schulthess Klinik in Zürich:

Drobny, Herren, Hersche, Leunig, Munzinger, Porchet, Preiss, Schwyzer, Simmen, Velasco